

無針注射器を使用した経皮的新規薬物  
送達方法論に関する基礎研究

井上 直子

## 目次

緒言	1
第1章 無針注射器による皮膚への薬物送達の可能性と効果	6
第1節 実験方法	6
1. 実験材料	6
2. 実験動物	7
3. 無針注射器 (Needle-free injector : NFI)	7
4. 射出力の測定	8
5. 摘出した皮膚からの放出実験	9
6. 皮膚中薬物分布の観察	10
7. 皮膚中ローダミン 6G 濃度の測定	10
8. <i>In vivo</i> 実験	11
第2節 理論	11
1. 薬物放出の解析	11
2. 血漿中濃度の解析	12
第3節 結果	12
1. シマジェットの射出力	12
2. シマジェットによって皮膚に送達されるローダミン 6G の量	13
3. ローダミン 6G の皮膚分布の観察	14
4. 射出した皮膚からのローダミン 6G の放出の評価	16
5. 放出実験後の皮膚中ローダミン 6G の濃度	18
6. NFI-s を使用して射出したときのローダミン 6G 血漿中濃度	19
第4節 考察	21
第5節 小括	24
第2章 ジクロフェナクとアンジオテンシン II の <i>in vitro</i> 皮膚透過性 に対するイオントフォレシスと無針注射前処理の相乗効果	25
第1節 実験方法	26
1. 実験材料	26
2. 実験動物	27
3. 皮膚膜の準備	27
4. <i>In vitro</i> 皮膚透過実験	28
5. 分析	29
第2節 結果	29
1. ジクロフェナクの皮膚透過性に対する NFI 前処理の効果	29

2.	ジクロフェナクの皮膚透過性に対する NFI 前処理と定電圧イオン トフォレシスの併用効果 .....	32
3.	ジクロフェナクの皮膚透過性に対する NFI 前処理と定電流イオ ントフォレシスの併用効果 .....	33
4.	アンジオテンシン II の皮膚透過性に対する NFI 前処理とイオン トフォレシスの併用効果 .....	34
第 3 節	考察 .....	37
第 4 節	小括 .....	41
第 3 章	経皮吸収に無針注射器を組み合わせた新規薬物送達システムの 基礎的研究 .....	43
第 1 節	実験方法 .....	44
1.	無針注射器 (Preci-Jet™, NFI : Needle-free injector) .....	44
2.	実験材料 .....	45
3.	実験動物 .....	47
4.	静注実験 .....	47
5.	<i>In vivo</i> 透過実験 .....	47
6.	皮膚の形態学的観察 .....	48
7.	<i>In vitro</i> 透過実験 .....	48
8.	分析 .....	49
9.	皮膚吸収率の推定 .....	49
10.	NFI 処理後角質に形成された穴の面積の測定 .....	49
11.	1 週間の <i>in vivo</i> 透過実験 .....	50
第 2 節	理論 .....	50
第 3 節	結果 .....	51
1.	NFI 処理皮膚を通した薬物の透過 .....	51
2.	NFI 処理の変更による薬物透過性の変化 .....	53
3.	NFI 処理の変更による皮膚状態の変化 .....	54
4.	NFI 処理による皮膚状態変化の透過性への寄与の評価 .....	56
5.	NFI 処理の距離の違いと透過性についての評価 .....	56
6.	NFI 処理と経皮吸収の継続性の評価 .....	57
第 4 節	考察 .....	58
第 5 節	小括 .....	61
結論	.....	62
謝辞	.....	68
引用文献	.....	69

## 緒 言

皮膚を投与部位とした薬物の全身への送達システム（Transdermal Drug Delivery System：TDDS）は、1981年にスコポラミンパッチが乗り物酔いの適用をFDAから承認され米国で発売されて以来、約30年の間に20品目前後の治療薬を含有する製品が発売され、臨床使用されている（Table 1）。我国でも1984年に硝酸イソソルビド貼付剤（フランドルテープ®）が発売されてから同様の製剤が発売され、多くの患者に使用されている。

TDDSは投与が簡便で皮膚から剥がすことによって投与が中止できる、血中濃度を長時間維持することができる、経口投与で問題となる肝での初回通過効果を回避でき、消化管での副作用を低減することができる、などの多くの利点があるが、皮膚への刺激性が欠点としてあげられる他に、一般的に薬物の皮膚透過性が非常に低い点が大きな問題である。皮膚は元来異物から人体を守るために存在しているため、皮膚に損傷を与えずに生体内に薬物を送達することは通常では非常に困難である。しかし、分子量が小さい、脂溶性が高い、融点が低いなどの条件が揃う一部の薬物は皮膚からの投与が可能で、さらに治療に必要な薬物量が少ない医薬品は製剤化の可能性が高いと思われる。（Table 1）。



**Table 1** Chemical parameter of drugs used in TDDS

一般名	欧 米	日 本	商品名	MW	MP	logKo/w	承認※
Scopolamine	○	×	Transderm Scop	303.35	59	0.9	1979
Nitroglycerin	○	○	Nitrol ニトロダームTTS	227.09	13.5	1.6	1983
Isosorbide dinitrate	×	○	フランドルテープS	236.14	70	1.3	1983
Clonidine	○	×	Catapres TTS	230.09	130	1.6	1984
Estradiol	○	○	Estraderm エストラーナテープ	272.38	178～179	4.0	1986
Fentanyl	○	○	Duragesic デュロテップMTパッチ	336.47	83～84	4.0	1990
Nicotine	○	○	Habitrol ニコチネルTTS	162.23	101	1.2	1991
Lidocaine	○	○	ペンレステープ Lidoderm	234.34	66～69	2.3	1994
Testosterone	○	×	Androderm	288.42	155	3.3	1995
Tulobuterol	×	○	ホクナリンテープ	227.73	89～91	2.3	1998
Oxbutynin	○	×	Oxytrol	357.49	129～130	4.2	2003
Selegiline	○	×	Emsam	187.28	108	2.8	2006
Methylphenidate	○	×	Daytrana	233.31	—	0.2	2006
Rotigotine	○	○	Neupro ニュープロパッチ	315.47	94～100	4.9	2007
Rivastigmine	○	○	Exelon リバスタッチパッチ	250.34	—	2.3	2007
Buprenorphine	○	○	Butrans ノルスパンテープ	467.64	217	5.0	2010

PubChem <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>

Daily Med <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed>>

※欧米・日本とも発売の製品は欄の上位（先に承認）の承認年を表示

現在も、皮膚透過における分子量や脂溶性の限界に対して、新規 TDDS の開発を目的とする様々な皮膚透過促進方法が研究されている。

皮膚透過促進方法は化学的促進法と物理的促進法の 2 つに大きく分類することができる。化学的促進法は製剤中に角層の抵抗性を減少させる物質を添加して主薬の皮膚送達性を向上させるもので、エタノール<sup>1)</sup>、メントール<sup>2)</sup>、脂肪酸<sup>3)</sup>など多くの物質で促進効果が報告され、実際に使用されている。また、薬物をプロドラッグ化して皮膚を透過させ、皮膚内の酵素で分解して薬効を発揮させるなどの透過促進法も行われている<sup>4)</sup>。物理的促進法は、電気エネルギーを使用するイオントフォレシス<sup>5,6)</sup> (iontophoresis) やエレクトロポレーション<sup>7-9)</sup> (electroporation)、超音波を使用するソノフォレシス<sup>10-12)</sup> (sonophoresis)、微細な針を皮膚に挿入して皮膚外層に小孔を形成するマイクロニードル<sup>13)</sup> (microneedle) などが研究されている。マイクロニードルは、シリコン、金属、ポリマー、またはコラーゲンおよびヒアルロン酸などの生体高分子材により形成されたもので、針の形状が注射針のように穴が開いているものと、開いていないものがある。また、皮膚にマイクロニードルを挿入後、皮膚から取り外す剤形と、生分解高分子製で皮膚中に残り分解される剤形が開発されている。Micro Hyala<sup>®</sup> (コスメディア製薬株式会社、京都) は、ヒアルロン酸の美容ケアとして開発され、資生堂から『ナビジョン』という名称で発売されているマイクロニードルの製品である。皮膚挿入後体液により溶解するヒアルロン酸のマイクロニードルで、真皮用 (800  $\mu\text{m}$ )、表皮用 (300  $\mu\text{m}$ )、角層用 (200  $\mu\text{m}$ ) と針のサイズが皮膚の深さに対

応している。現在インフルエンザワクチンのマイクロニードル製剤<sup>14)</sup>が臨床研究中で、今後の臨床応用が期待されている。

化学的促進法は、現在使用されている製剤に用いられている皮膚透過促進法であるが、高分子・水溶性薬物の経皮吸収促進は難しいのが現状である。物理的促進法はこれを補うことを目的に開発が進んでいる。今回使用した無針注射器（NFI: Needle-free injection）は、1986年にインスリンの自己注射用として開発された注射器である。これまで注射は針で皮膚から薬液を送達していたが、NFIは針を用いず、水圧で皮膚に薬液を送達する装置である。針への恐怖心や、針によって繰り返し皮膚を傷つけることを回避する目的で開発された。バネの力を利用して、液体を水圧で送達するNFIの他に、ワクチンや遺伝子を送達するために、粉末を高圧ヘリウムガスで皮膚に送達するNFIも使用されている<sup>15)</sup>。現在我が国で販売されているNFIのツインジェクターEZⅡ<sup>®</sup>（日本ケミカルリサーチ株式会社、兵庫県）は成長ホルモン剤自己投与用のNFIである。

NFIが経皮吸収バリアである角層に孔を形成するという機能を利用し、注射器としてだけでなく、注射の即効性と経皮投与の持続性を併せ持つ経皮投与剤形として利用できないかと考えた。しかし、NFIに関しては、インスリンを皮下注射した際に、注射針で皮下注射した場合と効果（血糖降下作用）は同等である<sup>16)</sup>という情報しか得られなかった。そのため、NFIによって形成される孔の大きさ、形成された孔が経皮吸収の透過ルートになる可能性、送達に適した薬物、この送達方法の継続性、などを明らかにする必要があると考えられた。そこで、これらの問題解決のために、第1章でNFIを皮膚から薬物を投

与する手段として使用する場合の性能を調べ、バネ定数、ノズル出口の角度、溶液の剤形による皮膚送達深度への影響と皮膚からの放出を調節する可能性を検討した。第 2 章では、角層に孔を形成する手段として NFI を用い、孔の上に適用した薬物溶液を皮内にポンプで押し込む役割として、高分子・水溶性薬物の物理的促進法であるイオントフォoresis を使用しその併用効果を検討した。また、第 3 章では *in vivo* で NFI と経皮吸収製剤を組み合わせた新規薬物送達方法を検討した。

## 第 1 章 無針注射器による皮膚への薬物送達の可能性と効果

無針注射器（NFI：Needle-free injector）は糖尿病治療薬のインスリンや低身長症などを治療する成長ホルモンの皮下注射用の注射器である<sup>17)</sup>。インスリン、成長ホルモンは食事ごと、あるいは毎日の投与が必要であるため自己注射が避けられない。そのため、針付の注射器に関しても様々な改良が加えられ、より自己注射し易いものが提供されている。しかし、針への恐怖心や皮膚を針で刺すという侵襲のある行為は避けることができない。このような背景から針のない注射器、NFI が開発された<sup>18,19)</sup>。

NFI は、皮下注射用として薬物の送達に関して針付シリンジと同等と報告されているが<sup>16)</sup>、薬物の皮内動態は明らかにはなっていない。そこでまず、NFI の射出力を種々条件下で測定し、さらに、色素を使用して射出液の各種条件下での皮膚送達状態を観察し、分布部位と分布量を調査した。また、皮内に送達された薬液がその後、皮膚からどのように放出されるかを *in vitro* 透過実験で調査し、さらに、一定時間放出後の、皮膚中薬物残存量を測定した。加えて、NFI で薬液を皮膚に射出後、*in vivo* で血中濃度を測定することによって、全身循環系への移行状況を明らかにし、新規薬物送達方法としての可能性について検討した。

### 第 1 節 実験方法

#### 1. 実験材料

ローダミン 6G は東京化学工業株式会社（東京）から購入した。ピロチオデカン(1-[2-(デシルチオ)エチル]ピロリジン-2-オン:HPE-101) は久光製薬株式会社（東京）から供与された。その他の試薬および溶媒は市販の特級もしくは HPLC 用を精製せずにそのまま使用した。Table 2 にローダミン 6G とピロチオデカンの構造式、分子量、ローダミン 6G の pKa およびピロチオデカンの logK<sub>0/w</sub> を示す。

**Table 2** Chemical structures and physicochemical properties of model compounds

	Structure	M. W.	
Rhodamine 6G		479.02	pKa 7.5
Pirotidecane		285.48	logK <sub>0/w</sub> 4.9

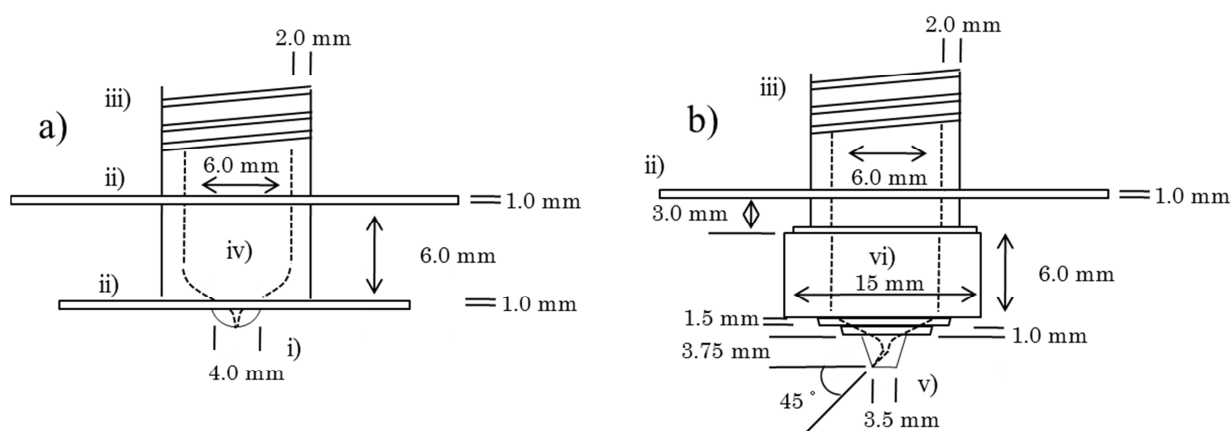
## 2. 実験動物

雄性ヘアレスラット（WBM/ILA-Ht、8-9 週齢、体重：200-250 g）は城西大学生命科学センター（坂戸、埼玉）もしくは石川実験動物研究所（深谷、埼玉）から購入した。すべての動物飼育および実験は城西大学動物実験規定に従って行った。

## 3. 無針注射器（Needle-free injector：NFI）

臨床でインスリン自己注射用に使用されていたバネを動力として薬

液を射出するシマジェット®（島津製作所、京都）を使用した。一般に使用されているバネ定数（15 N/mm）のもの（強バネ：NFI-s）とバネの力を 10.6 N/mm と弱く改良したもの（弱バネ：NFI-w）を使用して皮膚への射出力を測定し、薬物分布を観察した。シマジェット®に取り付けられるディスポーザブルノズル（Fig. 1a）は、先端から溶液を注射器にはかり取るものである。これに加えて、ノズルの向きが皮膚への薬物分布に影響するかについて、射出角度を 45° に改変したノズル（Fig. 1b）を使用した。45° のノズルは、皮膚のより浅い部分に薬液を送達することを目的として作成したものである。両者の流路の幅と開口部の直径は同じ大きさとした。

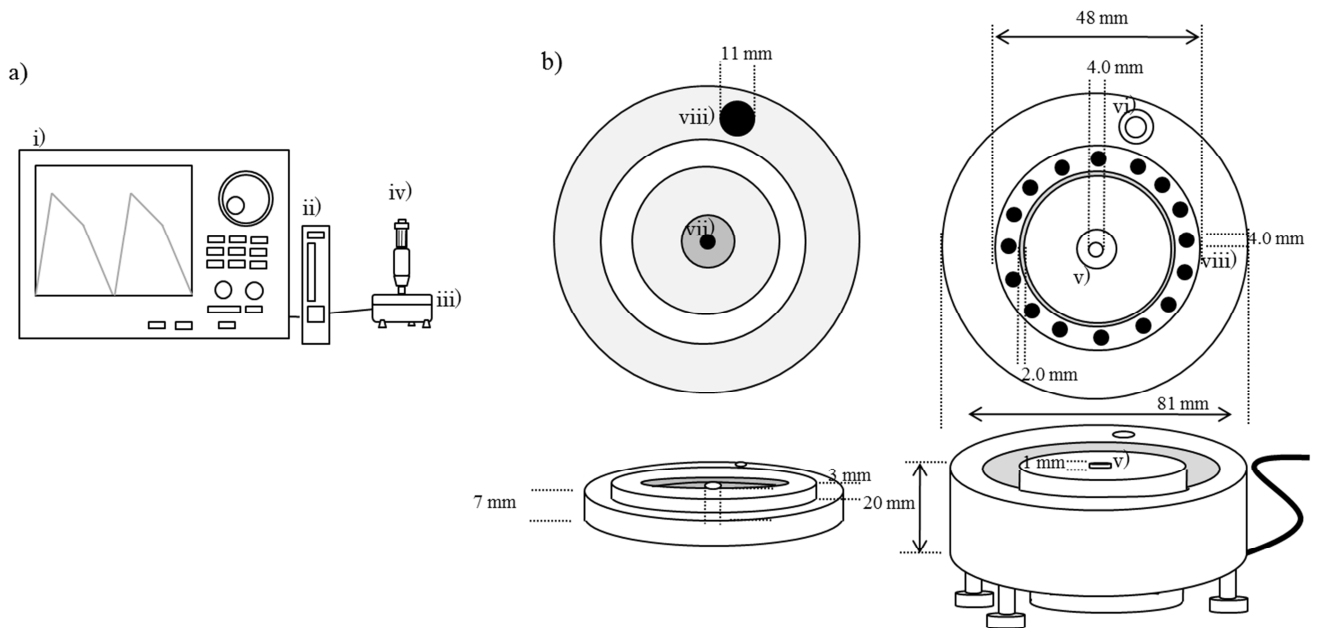


**Fig. 1** Diagram of normal and modified nozzles of ShimaJet®. a) Commercially available disposal nozzle: i) injection port, ii) nozzle-fixing bar, iii) screw thread, iv) solution-filling space. b) Modified nozzle: v) injection port, vi) solution-filling space made of brass.

#### 4. 射出力の測定

シマジェット®の射出力はジェット流力測定装置（TX-9A、藤本研究所、東京）（Fig. 2）で評価した。TX-9A はデジタル・オシロスコー

プ (DL716、Yokogawa Electric 社、東京) ( i )、センサーアンプ (DA-16A) ( ii ) とセンサー (TX-9UA) から構成される。TX-9UA は 2 つの主な部分に分けられ (Fig. 2b)、上部はシマジェット®をセットするベースで注入口 (vii) と水平確認用の窓 (viii) がある。下部はロードセル (v)、水平器 (vi)、注入口 (vii)、そして穴 (viii) がある。ロードセルは 1mm の高さである。射出力はオシロスコープで圧力 (1 N) を電圧 (1 V) に変換して測定される。シマジェット®のノズルの先端から TX-9UA の高感度ロードセルまでの距離は 8 mm である。



**Fig. 2** Setup for TX-9A system to detect injection force of ShimaJet®. a) TX-9 system: i) digital oscilloscope, ii) sensor amplifier, iii) TX-9UA, iv) ShimaJet®. b) diagram of TX-9: v) load cell, vi) level gauge, vii) injection port, viii) pore.

## 5. 摘出した皮膚からの放出実験

シマジェット®でローダミン 6G を射出したヘアレスラット背部摘



出皮膚を使って、放出実験を行った。ペントバルビタールナトリウムを腹腔内に注射（50 mg/kg）して麻酔した後、背部皮膚を摘出し、以前奥村らが報告した方法<sup>20)</sup>で実験した。NFI-w または NFI-s を使用して、ローダミン 6G 溶液（1.0 mg/mL、100  $\mu$ L）を摘出した皮膚に 4.9 N の一定の圧力で注射した。次に、皮膚膜をフランツタイプ拡散セル（有効拡散面積：1.77 cm<sup>2</sup>）に装着した。角層側はパラフィルム®で覆い、真皮側には pH7.4 のリン酸塩緩衝液（PSB）6 mL を適用した。あらかじめ設定した時間に 0.50 mL の溶液を真皮側のコンパートメントから取り、同量の PSB を、容量を一定にするために加えた。溶液のローダミン 6G 濃度は、蛍光分光光度計（RF5300PC；島津）を使用し 490 nm の励起光と 520 nm の蛍光波長で測定した。すべての動物実験は、城西大学で倫理委員会の承認を得て、城西大学動物実験ガイドラインに従って行った。

## 6．皮膚中薬物分布の観察

NFI-w または NFI-s でローダミン 6G を摘出皮膚に射出し、Tissue - TeK®O.T.C compound（サクラファインテック、大阪）に包埋、凍結し、20  $\mu$ m の水平あるいは垂直の切片をクリオスタット（CM3050S；ライカ、ウェツラー、ドイツ）により作成した。各々の標本のローダミン 6G の分布は、蛍光顕微鏡（CK40；オリンパス、東京）で観察した。

## 7．皮膚中ローダミン 6G 濃度の測定

ローダミン 6G 溶液を皮膚に射出した後、ただちにヘアレスラット

から背部皮膚を摘出し、ピンセットで細かく切断した。細かく切断した皮膚組織はメタノール中でポリトロン®ホモジナイザーを使用してホモジナイズし、4 °C、15,000 rpm で 3 分間遠心分離した。上澄みのローダミン 6G 濃度は蛍光分光光度計で測定した。また、皮膚切片 (20 μm) のローダミン 6G 濃度も、同様にメタノール抽出後測定した。

## 8. *In vivo* 実験

27 G 注射針を使用して静注、または NFI-s でラット背部皮膚に投与した後のローダミン 6G 血漿中濃度の時間推移を測定した。血液サンプルは頸静脈から経時的にサンプリングし、血漿を得るために 4 °C、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した。動物実験は、ウレタンを腹腔内投与し麻酔をかけて行った。

## 第 2 節 理論

### 1. 薬物放出の解析

無針注射をした皮膚からの薬物放出プロファイルは以下の式 1) で解析した<sup>21)</sup>。

$$Q = kt^n \quad (1)$$

$Q$  は皮膚から放出される薬物の累積量、 $k$  は放出速度定数、 $t$  は注射後の時間、 $n$  は放出指数である。放出指数  $n$  が 0.5 の時、その薬物の放出は Fick の法則に従う拡散 (Fickian 拡散) を示し、W. I. Higuchi

の式に従う<sup>22)</sup>。 $n$ の値が0.5より大きく1.0より小さい場合 ( $0.5 < n < 1.0$ ) non-Fickian 拡散となる。 $n=1$ の時はゼロ次の放出となる。

## 2. 血漿中濃度の解析

NFI-s によってラットの背部に注射されたローダミン 6G の血漿中濃度と時間の関係は、射出部位からの放出と体内からの消失が関与するため、以下の式でシミュレーションした。

$$V \frac{dC}{dt} = nkt^{n-1} - kel \cdot V \cdot C \quad (2)$$

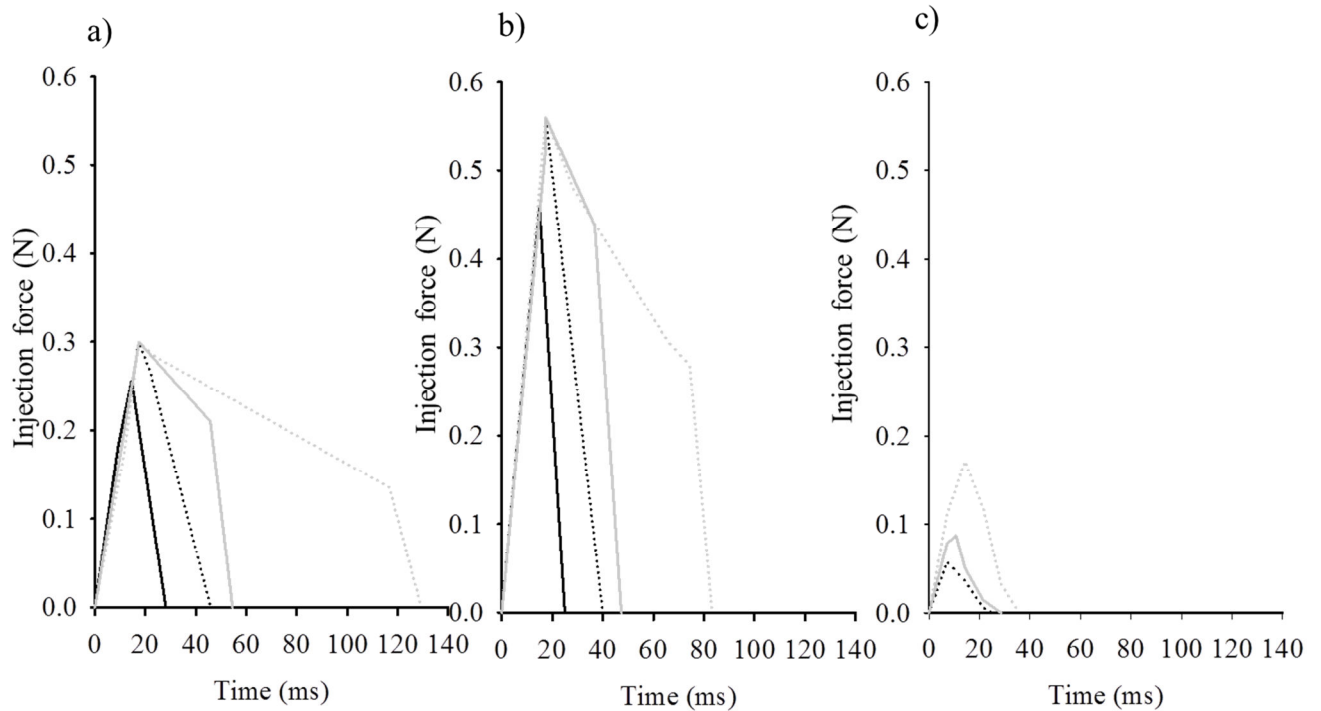
ここで、 $C$ はローダミン 6G 血漿中濃度、 $V$ と  $kel$ はそれぞれローダミン 6G の分布容積と消失速度定数である。定数  $k$ は理論の部の式 1) から計算した。 $V$ と  $kel$ は単回静脈内投与後の血漿中濃度と時間の関係から算出した。

## 第 3 節 結果

### 1. シマジェット®の射出力

Fig. 3a および b に通常シマジェット®用ノズルを使用し、バネ圧が異なる NFI-s と NFI-w で射出後の、射出力の時間推移を示す。NFI-w と NFI-s の両方とも、容量を 50  $\mu$ L から 250  $\mu$ L まで増加させると射出力も増加した。しかし、最大の射出力は 100  $\mu$ L で、それ以上はほぼ一定の値を示した。最大射出力に到達した後、射出力が減少する状態は、100  $\mu$ L を境にそれ以下と以上で異なった。射出力は注射量が

100  $\mu\text{L}$  未満の場合、最大の圧力に達した後すぐに減少したが、射出量が 100  $\mu\text{L}$  以上の場合、徐々に減少し、高い射出力を示す期間 (ms) は射出量に依存していた。Fig. 3c に、変更ノズル (Fig. 1 参照) を使用して NFI-s によって射出した後の射出力 (N) と時間 (ms) の関係を示した。変更ノズルの場合も通常ノズルと同様に射出量の増加に伴って射出力が増加したが、変更ノズルの射出力は通常ノズルに比べて非常に小さかった。



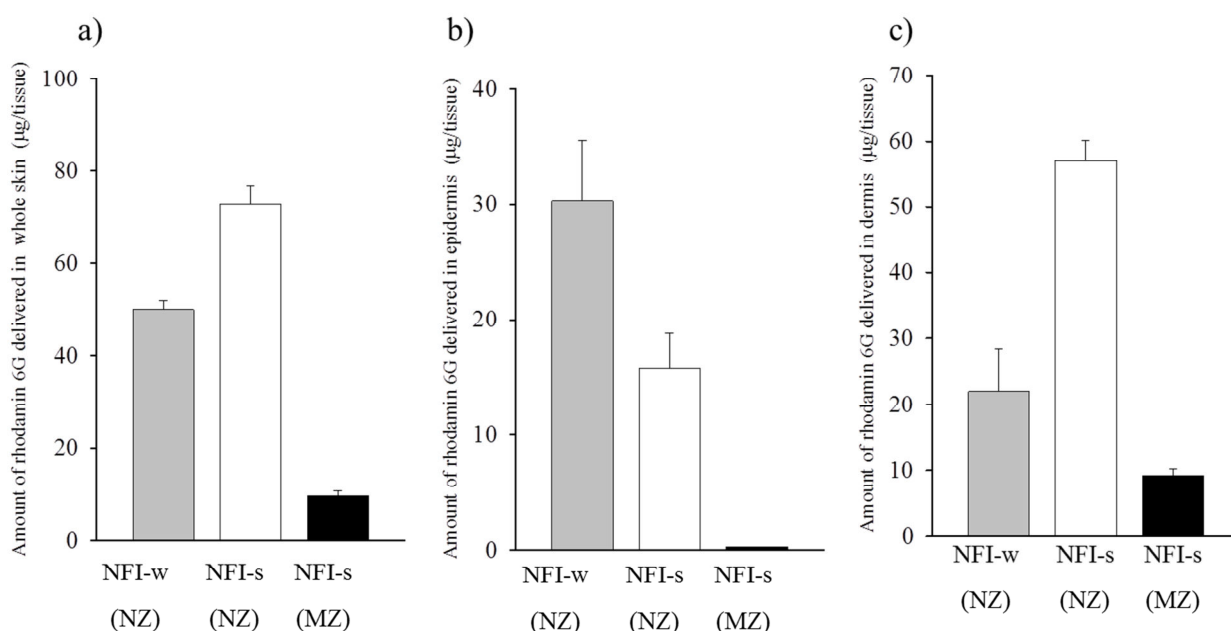
**Fig. 3** Effect of nozzle type and injection volume on the time course of injection force after injection by ShimaJet<sup>®</sup>. (a) NFI-w with normal nozzle, (b) NFI-s with normal nozzle, (c) NFI-s with modified nozzle

Lines: —: 50  $\mu\text{L}$ , ···: 100  $\mu\text{L}$ , - - : 125  $\mu\text{L}$ , ····: 250  $\mu\text{L}$  for injection volume.

## 2. シマジェット<sup>®</sup>によって皮膚に送達されるローダミン 6G の量

Fig. 4 に皮膚全層、表皮および真皮に送達されたローダミン 6G の量を示す。皮膚全層に送達されたローダミン 6G の量は、通常ノズル

を使用すると NFI-w で 50.1  $\mu\text{g}$ 、NFI-s で 72.8  $\mu\text{g}$  であった。ローダミン 6G はノズルの中と皮膚表面にも存在した。興味深いことに、送達されたローダミン 6G の分布量は 2 つのバネの間で非常に異なった。通常ノズルの NFI-w はローダミン 6G を皮膚の浅い部分に送達した。その結果、表皮部分は真皮に比べて約 1.5 倍高い値となった。一方、通常ノズルを使用した NFI-s では主に真皮にローダミン 6G が送達された。変更ノズルを使用して NFI-s で射出した場合、ローダミン 6G は皮膚全層に 9.5  $\mu\text{g}$  だけ送達され、その大部分は真皮に存在した。

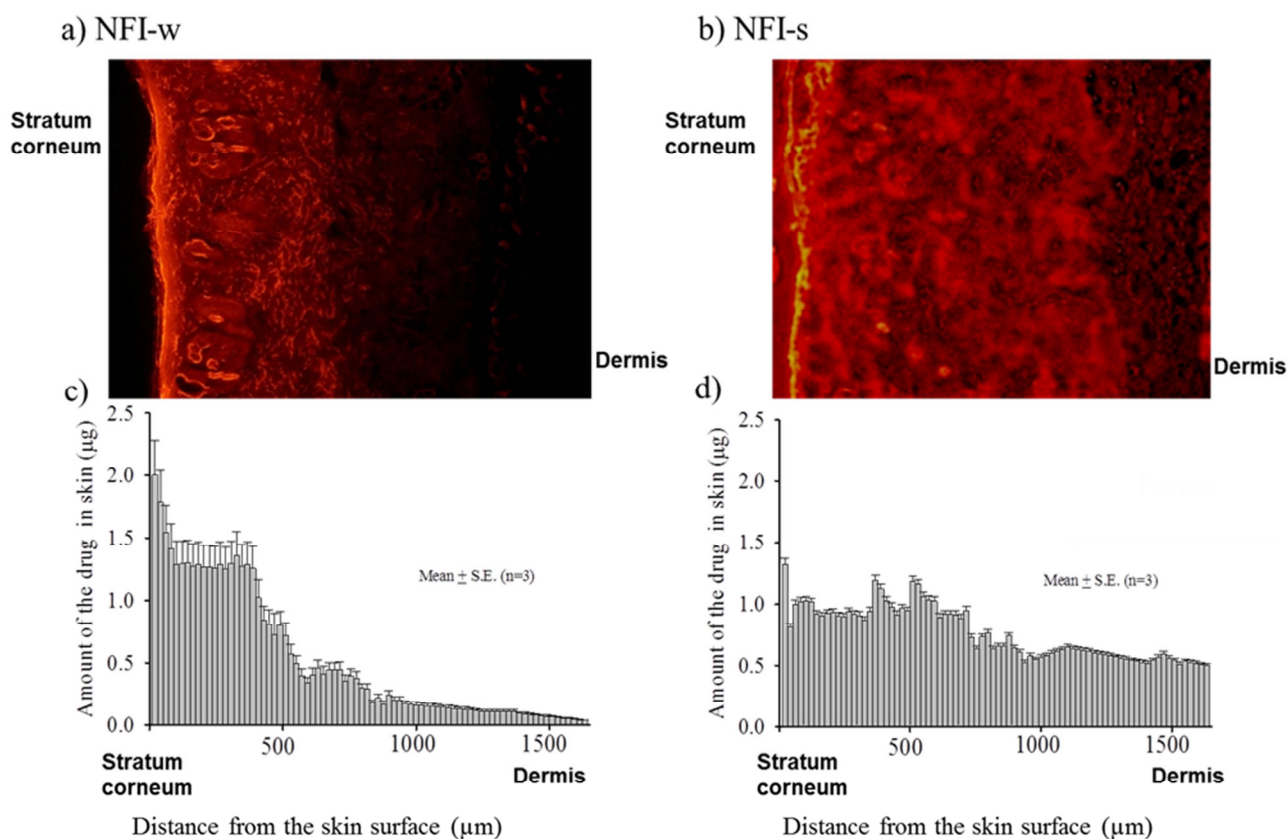


**Fig. 4** Effect of nozzle type on the rhodamine 6G concentration in skin after injection by ShimaJet®. Rhodamine 6G concentration in whole skin (a), epidermis (b) and dermis (c). Gray column: NFI-w with normal nozzle, open column: NFI-s with normal nozzle, closed column: NFI-s with modified nozzle. Abbreviations: normal nozzle (NZ), modified nozzle (MN).

### 3. ローダミン 6G の皮膚中分布の観察

Fig. 5a と b はそれぞれ NFI-w と NFI-s を使用して射出した皮膚中ローダミン 6G 分布を蛍光顕微鏡で観察したものである。NFI-w を使

用して射出した後のローダミン 6G は皮膚の浅い部分に観察され、NFI-s を使用して射出した後は皮膚全層で観察された。変更ノズルを使用し、NFI-s で射出した場合、ローダミン 6G は皮膚中にわずかに観察された。蛍光の強度も、通常ノズルを使用して NFI-w および NFI-s を使用して射出した場合に比べて非常に弱い値を示した。ノズルに角度を付けると、バネの力が射出力に有効に変換されないことが考えられ、ノズルの角度を変更するためには、NFI の構造から検討する必要があると思われた。変更ノズルでは皮膚にローダミン 6G を効果的に送達できないと判断し、以降の実験に関しては通常ノズルを使用することとした。Fig. 5c および d は、通常ノズルで NFI-w および NFI-s を使用して射出した後、皮膚表面からの異なる深さのローダミン 6G の量を示す。NFI-w は主に皮膚の浅い部分にローダミン 6G を送達し、大部分は皮膚表面から 500  $\mu\text{m}$  までのところで検出された。一方、NFI-s は皮膚中にローダミン 6G を均一に送達し、その量は皮膚表面から真皮の底部まで深さが異なってもほぼ等しかった。深さの違いによるローダミン 6G の送達量は蛍光で観察した結果と一致した。



**Fig. 5** Distribution of rhodamine 6G in skin after injection by NFI-w or NFI-s. a) and b) fluorescence image of rhodamine 6G in the skin, c) and d) rhodamine concentration in the skin.

#### 4. 射出した皮膚からのローダミン 6G の放出の評価

Fig. 6 と Table 3 に NFI から射出され、皮膚に形成された貯留部からのローダミン 6G の放出プロファイルを示す。放出速度定数  $k$  と指数  $n$  は、ローダミン 6G の放出時間曲線の累積透過量を両対数プロットして計算した。Table 3 に、計算した  $k$  と  $n$  の値を示した。NFI-w の  $k$  と  $n$  の値はそれぞれ  $1.18 \text{ h}^{-1}$  と  $0.7$  で、NFI-s は  $10.5 \text{ h}^{-1}$  と  $0.5$  であった。 $k$  の値は NFI-w が NFI-s に比べて非常に小さかった。

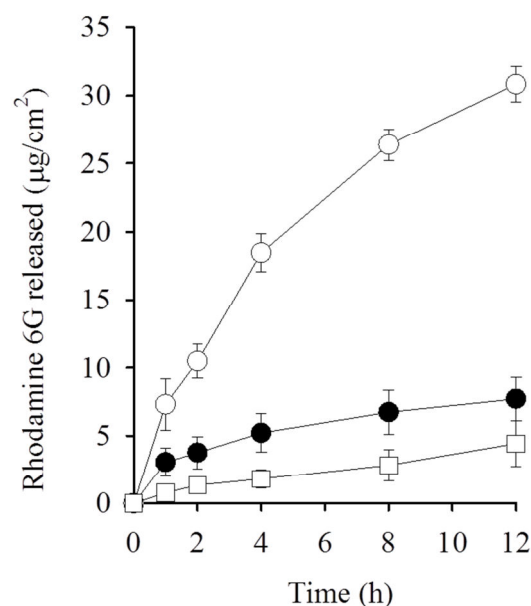
次に、皮膚透過促進剤（ピロチオデカン、HPE-101、久光製薬）の

効果を、皮膚に射出された貯留部からのローダミン 6G の放出量とローダミン 6G の分布から検討した。ピロチオデカン は 1.0 mg/mL ローダミン 6G 溶液に 1.0% の濃度で加え、均質化し O/W 型乳濁液とした。Fig. 6 と Table 3 に NFI-s で O/W 乳濁液を射出した後のローダミン 6G 量の時間推移と、O/W 乳濁液を射出した皮膚からのローダミン 6G の放出パラメータを示す。ローダミン 6G の放出は溶液に比べて O/W 乳濁液で減少し、 $k$  と  $n$  の値はそれぞれ  $0.78 \text{ h}^{-1}$  と 0.66 であった。皮膚に送達されたローダミン 6G の量は  $36.9 \text{ }\mu\text{g}$  で、NFI-s 使用にもかかわらず比較的低い値を示した。

**Table 3** Fickian release parameters of rhodamine 6G

	$k \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$n$	Release type
NFI-w	1.18	0.70	Non-Fickian release
NFI-s	10.5	0.50	Fickian release
NFI-s (pirotiodecane)	0.78	0.66	Non-Fickian release



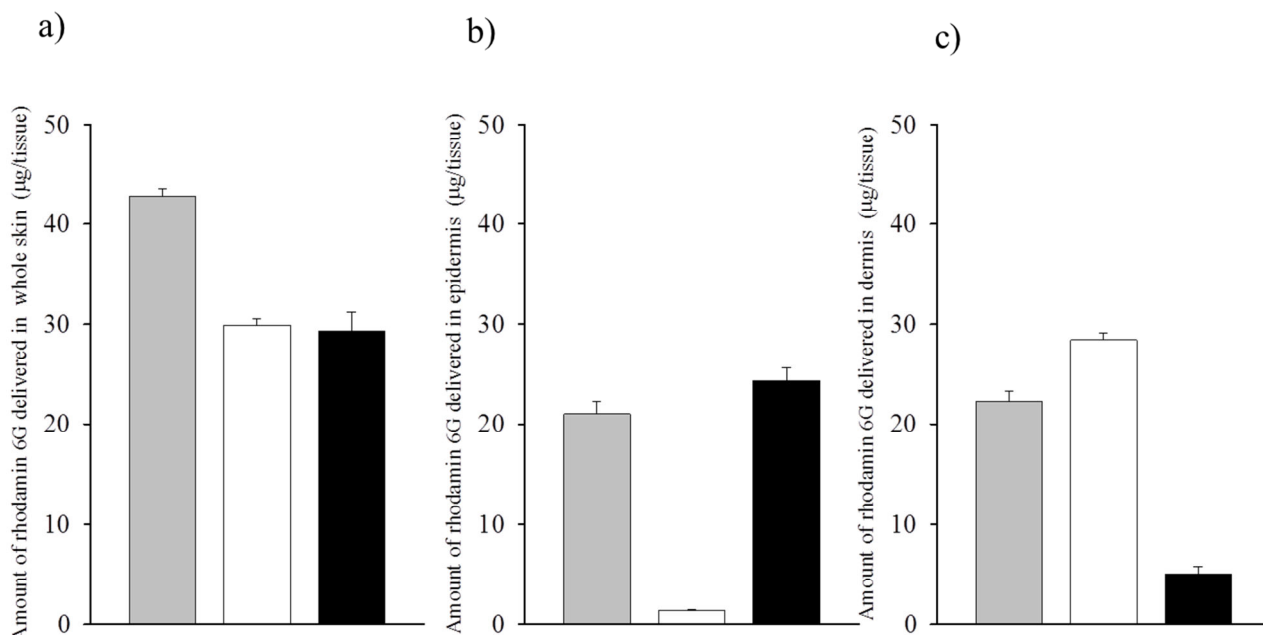


**Fig. 6** Effect of formulations on rhodamine 6G release from rat skin after injection by NFI-s.

Symbols: ○: Injection of 1 mg/mL rhodamine 6G solution by NFI-s, ●: Injection of 1 mg/mL rhodamine 6G solution by NFI-w, □: Injection of 1 mg/mL rhodamine 6G in 1% pirotidecane by NFI-s

## 5. 放出実験後の皮膚中ローダミン 6G の濃度

Fig. 7 に、皮膚に溶液または O/W 乳濁液を射出して、12 時間放出実験をした後の皮膚中ローダミン 6G 濃度を示す。Fig. 7a、b および c はそれぞれ、a : 皮膚全層、b : 表皮、c : 真皮のローダミン 6G 濃度である。興味深いことにローダミン 6G 濃度は、Fig. 4 の b と c に示すように、NFI-s を使用して射出したときに著しく減少し、反対に NFI-w を使用して射出したときは、12 時間後ほとんど皮膚に残った。さらに、O/W 乳濁液を射出したときは、12 時間以上皮膚中に保持された。

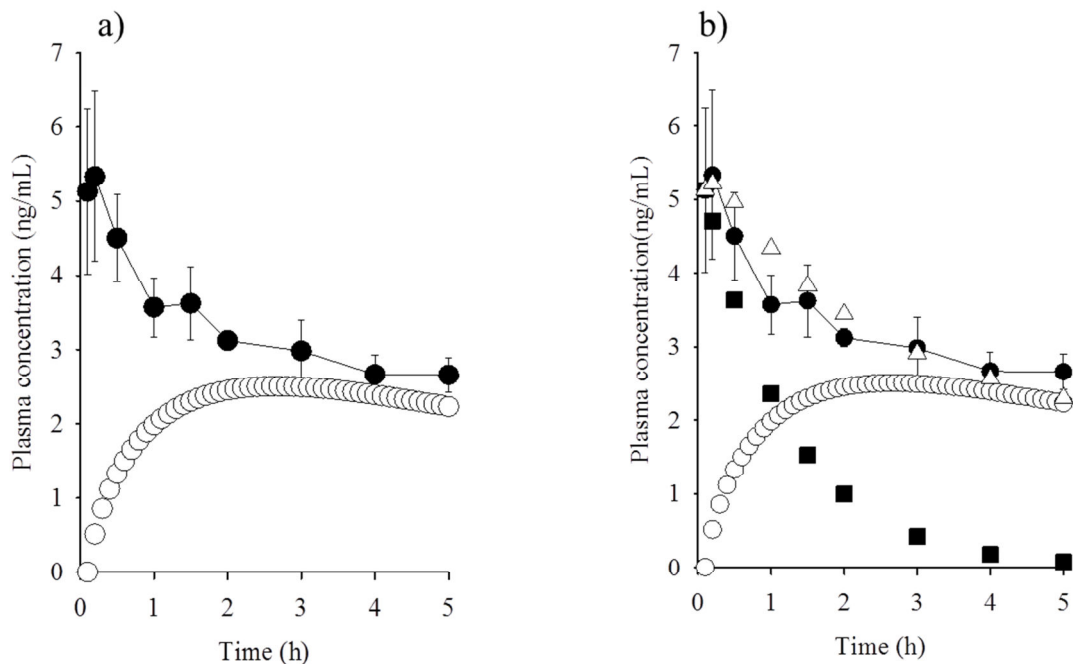


**Fig. 7** Skin concentration of rhodamine 6G 12h after skin permeation experiment. Rhodamin 6G concentration in whole skin (a), epidermis (b) and dermis (c). Gray bar: Rhodamine 6G injection by NFI-w, white bar: rhodamine injection by NFI-s, black bar: rhodamine 6G with pirotiodecane injection by NFI-s.

## 6. NFI-s を使用して射出したときのローダミン 6G 血漿中濃度

ラットに急速静注した時のローダミン 6G の消失挙動は、線形 1-コンパートメントモデルに従った。得られた消失速度定数  $kel$  と分布容積  $V$  はそれぞれ、 $1.15 \text{ h}^{-1}$  と  $2.0 \text{ L}$  であった。Fig. 8a に、ラットの背部皮膚に NFI-s を使って  $100 \text{ μL}$  の  $1.0 \text{ mg/mL}$  ローダミン 6G 溶液を射出した後、観察された血漿中濃度と、式 (2) からシミュレーションされた血漿中濃度推移を示す。 $C_{max}$  は射出から 15 分後に観察され、血漿中濃度は 5 時間以上にわたって徐々に減少した。シミュレーションされた曲線は、特に射出直後、観察された値と一致しなかった。この原因として、式 (2) からシミュレーションされた値は、ローダミン 6G が皮膚全層を通過した後で、皮膚微小血管床に吸収されると仮定しているが、実際の微小血管床は真皮の最深部以下に存在するのではな

く、真皮の中に存在することが考えられた。つまり、*in vitro* ではローダミン 6G は真皮を通過した後に血管に吸収されるが、生体ではこれより少し早い時期に吸収が開始され、ローダミン 6G の一部は皮膚への射出により直接血流に移行することが考えられた。そこで、Fig. 8b に、式 (2) によって計算された値と静注後のデータからシミュレーションした値を合計した値と、観察された値を示す。静注のデータからシミュレーションして得られた値は、NFI-s の注射後、皮膚から直接血液中に送達されたローダミン 6G の一部と推定される。血液中に送達されたローダミン 6G 量は  $11.8 \mu\text{g}$  で一致し、この算出された値は実測値と非常に近い値を示した。このような機序で、ローダミン 6G は NFI-s 注射後、皮膚から体循環へ送達されると考えられた。



**Fig. 8** Plasma concentration of rhodamine 6G after NFI-s injection. (a): observed (●) and simulated values obtained by eq. 2 (○). (b): observed value (●), simulated value calculated by eq. (2) (○), simulated value after *i.v.* injection of rhodamine 6G (■) and the sum of that calculated by eq. (2) and the simulated value after *i.v.* injection of rhodamine 6G (△).

#### 第 4 節 考察

角層バリアの突破は TDDS 開発のカギである。500 ダルトンルールで説明されるように、従来型の TDDS は薬物の分子量が 500 D を限界とした<sup>23)</sup>。そのため、タンパク質やワクチンのような高分子水溶性薬物を TDDS 製剤とすることは現状では困難である。

NFI は、皮膚の目標部位に薬物を送達するだけでなく、角層バリアを介さずに全身に薬物を送達するシステムである。角層バリアを克服する有望な方法として、マイクロニードル<sup>13)</sup>やエレクトロポレーション<sup>7)</sup>のような物理的方法も研究されている。これらの方法の中で、NFI は皮膚に高用量の薬物を送達することが可能である。いくつかの研究で NFI の薬物送達性は有効であると報告された<sup>24,25)</sup>が、無針注射後の皮内動態と注射された薬物の分布について検討したものは少なかった。一方、いくつかの研究は、皮下注射後の薬物の皮内動態と注射部位から全身循環系への薬物移行を報告しており、皮下注射後の皮膚中の薬物動態は、典型的な TDDS 適用後と非常に異なることが報告されている<sup>26,27)</sup>。

シマジェット®を使用して 1.0 mg/mL のローダミン 6G を 100  $\mu$ L 注射した時のローダミン 6G 量はバネ定数およびノズルの形状に大きく影響された。通常ノズルの NFI-w 使用と変更ノズルの NFI-s 使用は、最大射出力で角層バリアを破壊するのに十分でなく、送達量が少なかった。しかしながら、NFI-w による注射は皮膚の浅い部分に選択的にローダミン 6G を送達することが示された。現在までの結果から、NFI は皮膚から薬物を投与することを考えた場合、皮膚に選択的に薬物を送達できる独創的な装置であるが、薬物送達量を増加させる改善をす

る必要があることが示唆された。

NFI-w と NFI-s を使用して注射した後のローダミン 6G 放出プロファイルは、それぞれ拡散制御および膜制御<sup>21)</sup>後の挙動に相当すると考えられた。これらの異なる放出プロファイルは、NFI-w と NFI-s を使用して注射した場合の、皮膚分布に依存した。分布したローダミン 6G は皮膚中の異なる拡散経路を使って拡散すると推定される。さらにまた、ローダミン 6G の物理化学的性質が放出プロファイルに影響した可能性も考えられる。一度に皮膚中に注入された大量の溶液は、皮膚組織の物理化学的性質および構造を変える可能性がある。また、皮膚表面と真皮の pH はそれぞれ 4.5–5.5 と 7.2 で<sup>28)</sup>、ローダミン 6G の pKa は 7.5 である。ゆえに、ローダミン 6G は主に陽イオンとして存在しており、負に帯電している表皮の皮膚細胞と相互作用を起こす可能性がある。NFI-w を使用してリドカインのような塩基を注射すると、適用部位での効果発現が早く、効果が持続するが、NFI によって皮膚中に形成された貯留層からの薬物の放出機構を明らかにするためにはさらに詳細な研究が必要であると思われる。経皮吸収促進剤として使用されるピロチオデカンを追加して得られる乳濁液は、貯留層からのローダミン 6G の放出に変わった特徴を示した。すなわち、NFI-s を使用してピロチオデカンを含む乳濁液を注射した場合、皮膚に送達されるローダミン 6G の量は、ピロチオデカンを含まないローダミン 6G 溶液を注射した時より低い値を示した。ピロチオデカン乳濁液を注射して送達されるローダミン 6G の量は減少したが、表皮のローダミン 6G の保持時間は延長し、皮膚からの放出率は減少した。NFI を使用した乳濁液の送達は、特に投与部位での早い効果発現と作用の持続性を

必要とする局所作用薬に有用であると考えられた。また、この方法は、生体分解性のナノ／マイクロ小球体の懸濁液やリポゾーム製剤にも適用できると考えられる。

NFI では皮膚中に薬物を送達するために、圧縮ガスを使用することがある<sup>29)</sup>が、本研究ではバネの力を使用したシマジェット®を装置として選択した。本章に示したように、薬物の送達深度は、ノズルの形を変更することによって調節が可能であると考えられた。この変更ノズルはバネの力を利用したシマジェット®だけでなく、圧縮ガスの力を利用するバイオジェクターにも応用できると考えられる。

皮膚組織に送達される注射液の容量と剤形は、薬物の皮膚動態に大きな影響を与えることが報告されている<sup>30)</sup>。NFI-s は大量の溶液を皮膚中に送達し、この送達技術は従来の TDDS に比較して、薬物の皮内動態を変える可能性がある。本章で得られた結果は、NFI で薬液を皮膚に射出することによって形成される薬液分布は、薬物放出を制御する貯留層として機能する場合、表皮あるいは表皮および真皮を利用した新規薬物送達システムとして有用であることを示唆している。

*In vitro* での放出データを用いて算出した血中濃度の理論値は、特に投与初期において、実験結果と異なっていた。この差は、皮膚中の微小血管床へのローダミン 6G の移行によるものと考えられ、この結果から NFI-s によって注射された後、一部が微小血管床に直接移行したことが示唆された。

以上のことから、NFI-w と NFI-s がそれぞれ局所と全身に薬物を送達する装置として利用可能であることが明らかとなった。

## 第 5 節 小括

シマジェット®を使用して注射した場合の、ローダミン 6G の皮膚への送達深度と皮膚からの放出プロファイルは、バネ定数、ノズル出口の角度、および適用溶液の剤形によって調節することが可能であると考えられた。しかしながら、現在までの結果から、射出角度を変えたノズルを使用した場合や、射出溶液として乳濁液を使用した場合、通常ノズルを使用して NFI-s で溶液を注射したときに比べて薬物送達率が低下することが示されたことから、シマジェット®を用いた送達技術において、薬物送達深度の調節を改善する必要があると考えられた。今後は、NFI によって更に効果的で制御可能な送達が得られるように、薬物の皮膚中送達深度や保持時間と、薬理的効果の発現と消失との関係について調査する必要があると思われた。また、NFI 注射後の血中濃度推移から、注射の即効性と経皮吸収製剤の持続性を併せ持つ投与剤形としての可能性が考えられた。

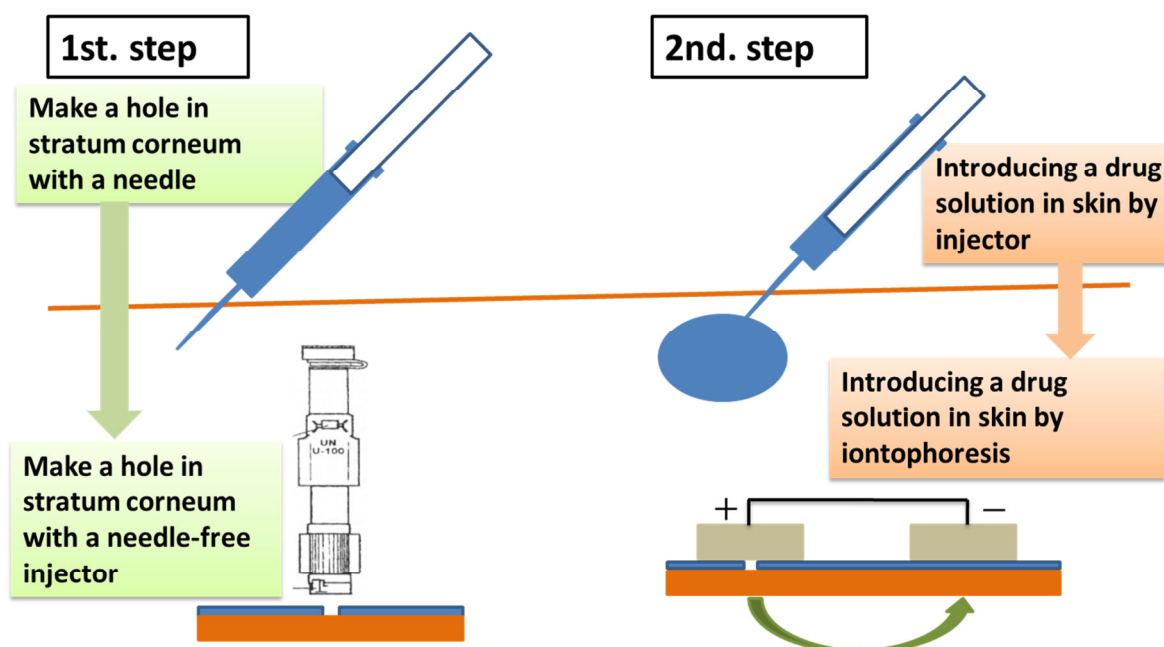
## 第2章 ジクロフェナクとアンジオテンシンⅡの *in vitro* 皮膚透過性に対するイオントフォレシスと無針注射前処理の相乗効果

イオントフォレシスは電気エネルギーを利用した物理的皮膚透過促進法として有望な方法の一つである<sup>31-33)</sup>。皮膚に陽極と陰極を設置し、正に帯電する塩基性薬物は陽極に、負に帯電する酸性薬物は陰極に封入して皮膚に電流を流すと、電氣的な反発 (electrorepulsion) によって薬物が皮膚の中へと移動して経皮吸収が促進される。透過ルートは電気抵抗の少ない毛嚢や汗腺などの付属器官である。また、電流とともに陽極から陰極に水の流れ (electroosmosis) が生じ、電荷を持たない非イオン性の薬物も水に溶解していれば皮膚に透過させることが可能である<sup>34)</sup>。これによって、高分子の電解質 (タンパク質、ペプチドなど) の皮膚透過が可能になった。さらにイオントフォレシスは、電圧、電流を調整することによって薬物の投与速度をコントロールすることができる。リドカインとエピネフリンを併用した局所麻酔薬や、フェンタニルを使用した術後疼痛管理用の薬剤の他、検査用として時計型グルコースモニタリング装置もイオントフォレシスを使用した製品として開発されている。

Fig. 9 に示すように、通常、皮内注射をする場合は、注射器で角層に孔を開けた後にピストンで薬液を皮内に押し込む操作をするが、無針注射器<sup>16)</sup> (NFI : Needle-free injector) で角層に孔を形成する前処置は、この針で角層に孔を開ける操作に該当すると考えられる。イオントフォレシスは、この孔からピストンで薬液を皮内に押し込む操作



と同様の作用をするのではないかと考えた。そこで、本章では、NFIで皮膚に孔を形成する前処理と、イオントフォレシスの組み合わせが、薬物の皮膚透過性を上昇させるかについて評価した。モデル薬物として、分子量が小さいジクロフェナクと大きいアンジオテンシンⅡ<sup>35)</sup>を使用し、種々条件下でイオントフォレシスを実施し、経皮吸収促進効果を評価した。



**Fig. 9** Conceptual diagram of the combination use of needle-free injector and iontophoresis.

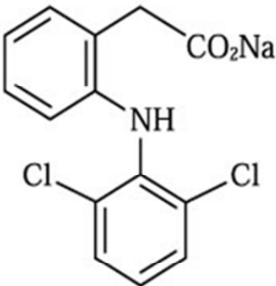
## 第 1 節 実験方法

### 1. 実験材料

ジクロフェナクナトリウムは和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。凍結したアンジオテンシンⅡはシグマ・アルドリッチ株式会社（セントルイス、MO、米国）、トリチウム標識化アンジオテンシンⅡは第一化学薬品株式会社（現・積水メディカル株式会社、東京）か

らそれぞれ購入した。その他の試薬は、特級もしくは HPLC 用を精製せずにそのまま使用した。Table 4 にジクロフェナクナトリウムとアンジオテンシン II の構造式、分子量、ジクロフェナクナトリウムの pKa およびアンジオテンシン II の pI を示す。

**Table 4** Chemical structures and physicochemical properties of model compounds

	Structure	M. W.	
Diclofenac sodium		318.13	pKa 4.0
Angiotensin II	<b>Asp- Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe - OH</b>	1296.49	pI 7.7

## 2. 実験動物

雄性ヘアレスラット（WBM/ILA-Ht、7－8 週齢、体重：200-240 g）は城西大学生命科学センター（坂戸、埼玉）または、石川実験動物研究所（深谷、埼玉）から購入した。すべての動物飼育および実験は城西大学動物実験規定に従って行った。

## 3. 皮膚膜の準備

ラットを麻酔（ペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg、*i.p.*）し、腹部皮膚を摘出した。生理食塩液（60  $\mu$ L）を無針注射器<sup>16)</sup>（プレシジェット®、メディジェクト株式会社、ミネアポリス、MN、米国：現・

アンタレスファーマ株式会社) で皮膚に直接、あるいは注射器の先端と皮膚の間の距離を 10 mm<sup>36)</sup>にするためのスパーサーを使用して注射した。皮膚バリアに 1 つ、あるいは 3 つの孔を形成するために、それぞれ皮膚表面で 1 回、あるいは異なる部位に 3 回注射した。無針注射の前処理を行わない皮膚を比較のために使用した。

#### 4. *In vitro* 皮膚透過実験

摘出したヘアレスラット腹部皮膚をイオントフォレシス用の 2 チャンバー拡散セル (セル容積 4.0 mL、有効拡散面積 0.95 cm<sup>2</sup>) に挟み、透過実験<sup>37)</sup>を行った。1/30 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.4、4 mL) にジクロフェナクナトリウムあるいはアンジオテンシン II を加え、角層側のセルに適用し、真皮側のセルには緩衝液のみを適用した。ジクロフェナクナトリウムとアンジオテンシン II はそれぞれ 5 mg/mL と 0.1% の濃度で調製した。また、トリチウム標識化アンジオテンシン II を使用して皮膚透過性を測定した。電極には白金電極を用い、ドナー側を陰極に、レシーバー側を陽極にセットした。イオントフォレシス適用時は、電源装置 (DMR-20-2、メトロニクス株式会社、東京：現 メトロテック株式会社) を使用し、デジタル式複合記録機 (TR-6843、竹田理化株式会社、東京) で記録した。定電圧と定電流イオントフォレシスを行った。定電圧では、ジクロフェナクは 0.5 V で、アンジオテンシン II は 0.2 V でそれぞれ透過実験を行い、定電流ではジクロフェナクでは 0.1 mA と 0.3 mA で、アンジオテンシン II は 0.3 mA で行った。なお、比較電極を塩橋でつないだ。ドナーとレシーバーのセルは、スターヘッドスターラーで速度同期電動機 (MC-301、サイニクス株式

会社、東京)を用いて、1200回転/分の一定速度で攪拌した。透過実験は37℃で実施した。レシーバー溶液(0.1 mL)をあらかじめ設定した時間にサンプリングし、分析した。

## 5. 分析

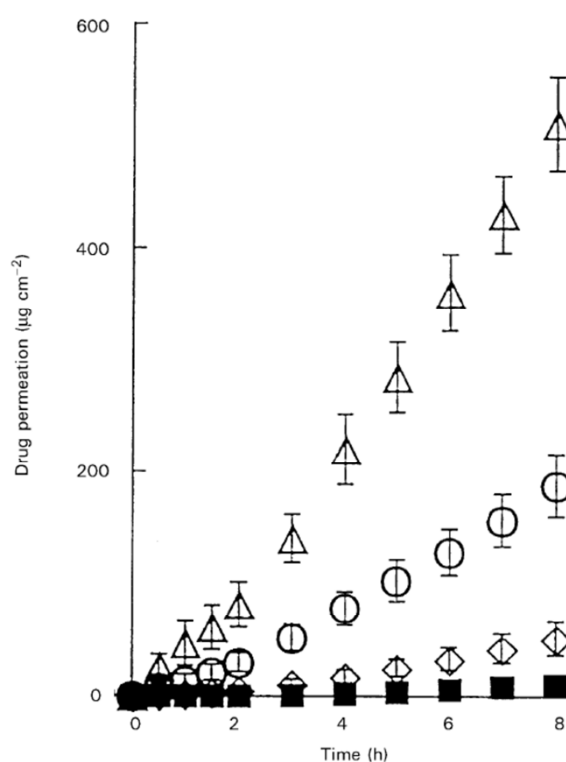
ジクロフェナクを含有するレシーバーサンプルは、*p*-ヒドロキシ安息香酸イソプロピルを内部標準として含有するメタノール:0.1%リン酸(7:3)同量と混和し、遠心分離した。上澄み(50 µL)のサンプルを、ポンプ(LC-6A、島津製作所、京都)、紫外線検出器(SPD-6A、島津)、インテグレーター(CR3A、島津)と逆相カラム(Inertsil ODS, 4.6 mm×250 mm、ジーエルサイエンス株式会社、東京)からなるHPLCシステムに注入した。移動相はメタノール:0.1%リン酸(7:3)で、流速は1.0 mL/min、検出器はUV286 nmで、カラム温度は室温とした。トリチウム標識化アンジオテンシンIIを含有するレシーバー液はシンチレーションカクテル10 mLと混和し、一晩放置した。その後、液体シンチレーションカウンター(LSC-700、日立アロカメディカル株式会社、東京)を使用して放射活性を測定した。

## 第2節 結果

### 1. ジクロフェナクの皮膚透過性に対するNFI前処理の効果

薬物の皮膚透過促進に及ぼすNFIとイオントフォレシスの併用効果を評価する前に、ジクロフェナクの*in vitro*皮膚透過性に対するNFI前処理の影響を評価した。Fig. 10にNFIを皮膚に接触させて注射した時と、皮膚から10 mm離して注射した時の皮膚を透過したジクロフ

エナクの累積皮膚透過量を示す。結果を Table 5 にまとめた。皮膚表面に接触させて注射した場合、定常状態フラックスはコントロールと比較して 4 倍に、皮膚より 10 mm 上から注射した場合 13 倍になった。皮膚表面に接して注射した場合よりも、皮膚から 10 mm 上にセットして注射した場合により短いラグタイムとなった。次に、ジクロフェナクの皮膚透過を更に促進させるために 3 回 NFI 処理を行った。また、得られた結果を 1 回の処理で得られた結果と比較した。Fig. 10 と Table 5 にジクロフェナクの皮膚透過データを示す。NFI 3 回処理の場合、同 1 回処理に比べてフラックスは約 3 倍高く、コントロールに比べて 37 倍高い値を示した。



**Fig. 10** Effects of different jet injector pretreatment schedules on the permeation of diclofenac sodium through hairless rat skin. Control, ■; single jet injection directly onto the skin surface, ◇; single jet injection 10 mm above the skin surface, ○; triplicate jet injection 10 mm above the skin surface, △. Each data point represents the mean  $\pm$  s.e.m. of 3-6 replicates.

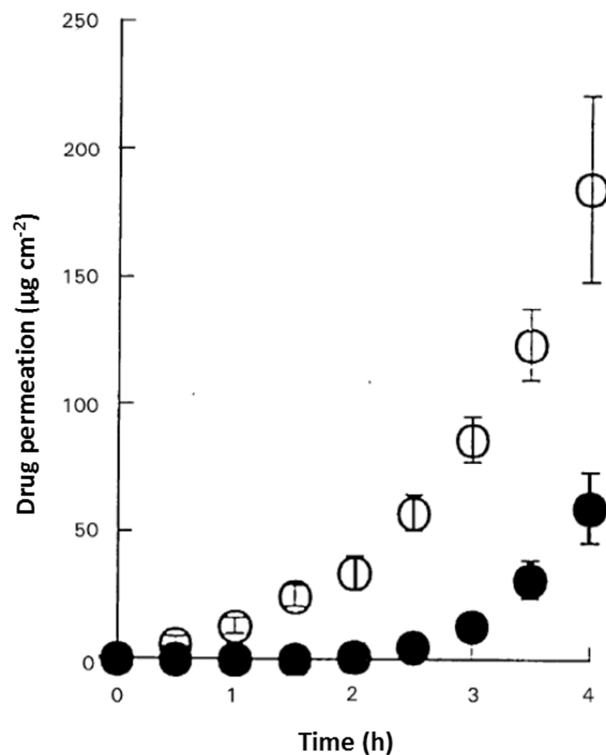
**Table 5.** Effects of different types of jet injector and iontophoresis treatment on the permeation parameters of diclofenac sodium ( steady-state flux (Jss) and lag time) through hairless rat skin and electrical parameters (potential difference (Vss), electric current (Iss) and membrane resistance (Rss)) at steady state.

	Jss ( $\mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$ )	Lag time (h)	Vss (V)	Iss (mA)	Rss ( $\Omega$ )	Ref.
Control	1.96 $\pm$ 0.23	2.66 $\pm$ 0.32				Figure 10
1 $\times$ JI (0 mm)	7.81 $\pm$ 0.84	1.55 $\pm$ 0.18				
1 $\times$ JI (10 mm)	26.30 $\pm$ 3.65	0.98 $\pm$ 0.18				
3 $\times$ JI (10 mm)	71.83 $\pm$ 5.35	0.96 $\pm$ 0.17				
0.5 V IP	46.22 $\pm$ 10.04 <sup>a</sup>	2.74 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	0.5	0.433 $\pm$ 0.038*	1.15	Figure 11
0.5 V IP + 1 $\times$ JI (10 mm)	98.76 $\pm$ 16.93 <sup>a</sup>	2.16 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	0.5	0.688 $\pm$ 0.087*	0.72	
0.1 mA IP	14.76 $\pm$ 5.43	1.08 $\pm$ 0.07	0.092 $\pm$ 0.084	0.1	0.92	Figure 12
0.1 mA IP + 1 $\times$ JI (10 mm)	33.03 $\pm$ 4.61	0.84 $\pm$ 0.08	0.051 $\pm$ 0.031	0.1	0.51	
0.3 mA IP	57.26 $\pm$ 4.40	1.24 $\pm$ 0.17	0.360 $\pm$ 0.088	0.3	1.20	
0.3 mA IP + 1 $\times$ JI (10 mm)	45.96 $\pm$ 5.36	0.50 $\pm$ 0.05	0.246 $\pm$ 0.042	0.3	0.82	

Each value represents the mean or the mean  $\pm$  s.e.m. of 3-6 replicates. n  $\times$  JI (a mm): n times jet injection (JI) set at a mm over the skin surface; IP; iontophoresis. Rss was calculated according to Ohm's law. <sup>a</sup> Average value calculated from the last three sampling points (Figure 11).

## 2. ジクロフェナクの皮膚透過性に対する NFI 前処理と定電圧イオントフォレシスの併用効果

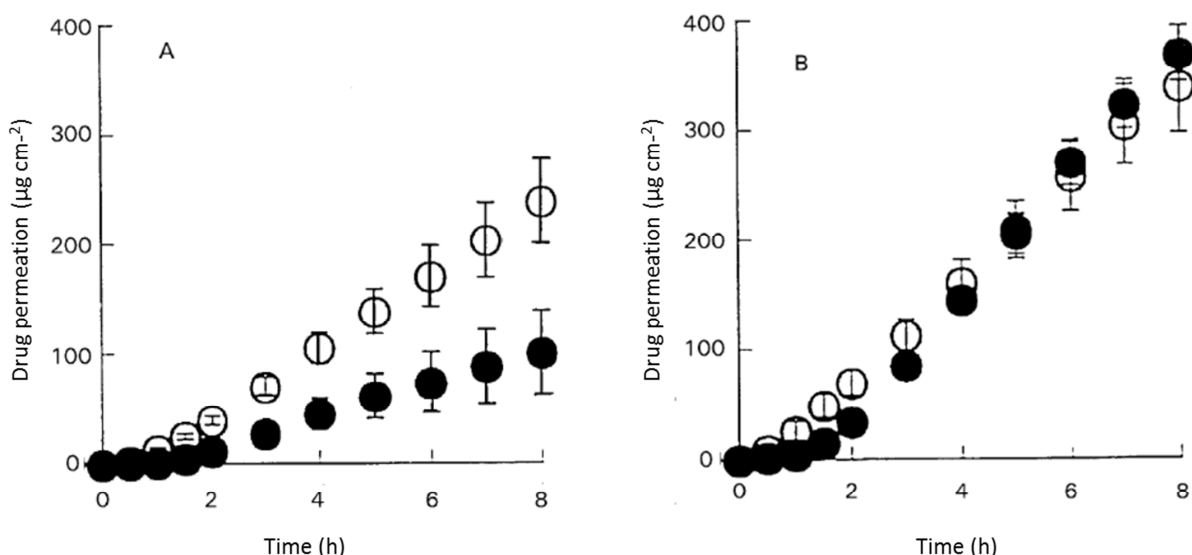
NFI 前処理（1 回注射）がある場合とない場合で 0.5 V イオントフォレシスを行い、皮膚を透過したジクロフェナクナトリウムの累積透過量を Fig. 11 に表す。イオントフォレシス単独に比べて併用での 4 時間の累積透過量は 3 倍になった。また、Table 5 に示すように、定電圧イオントフォレシスを実施している間の皮膚を通る平均の電流値は、NFI 前処理がある場合 0.69 mA/cm<sup>2</sup> で、NFI 前処理なしの場合の 0.43 mA/cm<sup>2</sup> に比べて大きかった。



**Fig. 11** Combined effects of jet injector pretreatment and constant voltage iontophoresis on the permeation of diclofenac through hairless rat skin. Constant voltage (0.5 V) iontophoresis alone, ●; single jet injection 10mm above the skin surface with constant voltage (0.5 V) iontophoresis, ○. Each data point represents the mean ± s.e.m. of 3-6 replicates.

### 3. ジクロフェナクの皮膚透過性に対する NFI 前処理と定電流イオントフォレシスの併用効果

Fig. 12A と 12B はそれぞれ 0.1 mA と 0.3 mA の定電流イオントフォレシスを実施した時の、1 回 NFI 前処理で注射した皮膚を通るジクロフェナクの累積透過量を示す。Table 5 には透過と電気的データを示す。定電流イオントフォレシスのすべての透過プロファイルは、定電圧イオントフォレシスと異なり、短いラグタイムの後に定常状態フラックスが得られた。Fig. 12A (0.1 mA イオントフォレシス) で示すように、NFI 前処理を実施したイオントフォレシスのフラックスは前処理をしていない場合に比べて増大した。0.3 mA イオントフォレシス (Fig. 12B、Table 5) では、定常状態フラックスは、前処理がある場合は前処理がない場合に比較して高くはなかったが、ラグタイムは前処理によって短縮された。



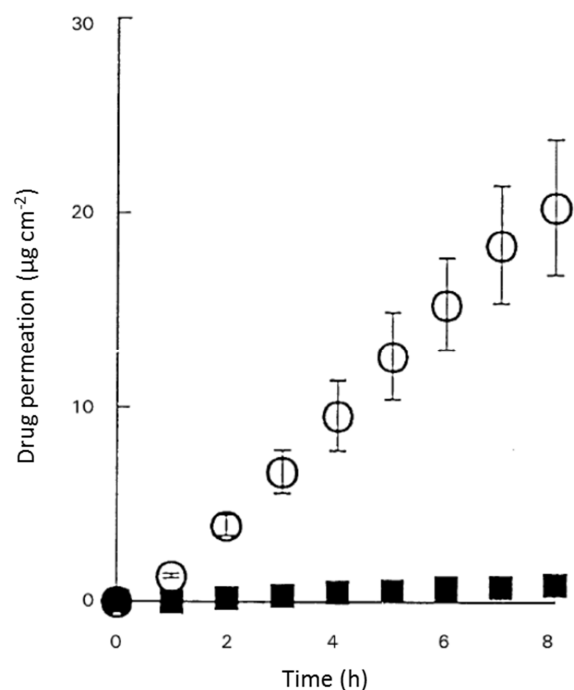
**Fig. 12** Combined effects of jet injector pretreatment and constant current iontophoresis on the permeation of diclofenac sodium through hairless rat skin. Constant current (0.1 (A) and 0.3 mA (B)) iontophoresis alone, ●; single jet injection 10 mm above the skin surface with constant current (0.1 (A) and 0.3 mA (B)) iontophoresis, ○. Each data point represents the mean ± s.e.m. of 3-6 replicates.



#### 4. アンジオテンシンⅡの皮膚透過性に対する NFI 前処理とイオントフォレシスの併用効果

アンジオテンシンⅡの皮膚透過に対する NFI 前処理とイオントフォレシスの併用効果について評価した。まず、併用効果を調べる前に、NFI 前処理がアンジオテンシンⅡの皮膚透過に与える影響について評価した。

Fig. 13 は、対照と NFI 前処理（1 回注射）で皮膚を透過したアンジオテンシンⅡの累積透過量を示す。両グループとも短いラグタイムの後、透過の定常状態となった。Table 6 に定常状態フラックスとラグタイムを示す。アンジオテンシンⅡの皮膚透過速度（フラックス）は対照群の約 22 倍高い値となった。次に、NFI と定電圧イオントフォレシスの併用効果について評価した。Fig. 14A に 0.2 V イオントフォレシスのみと NFI 前処理をして 0.2 V イオントフォレシスを実施した時の皮膚を透過したアンジオテンシンⅡの累積透過量を示す。NFI を併用した場合はイオントフォレシス単独よりも 5.5 倍高いフラックスを示し、NFI 単独（Table 6）で観察された値の約 2 倍となった。



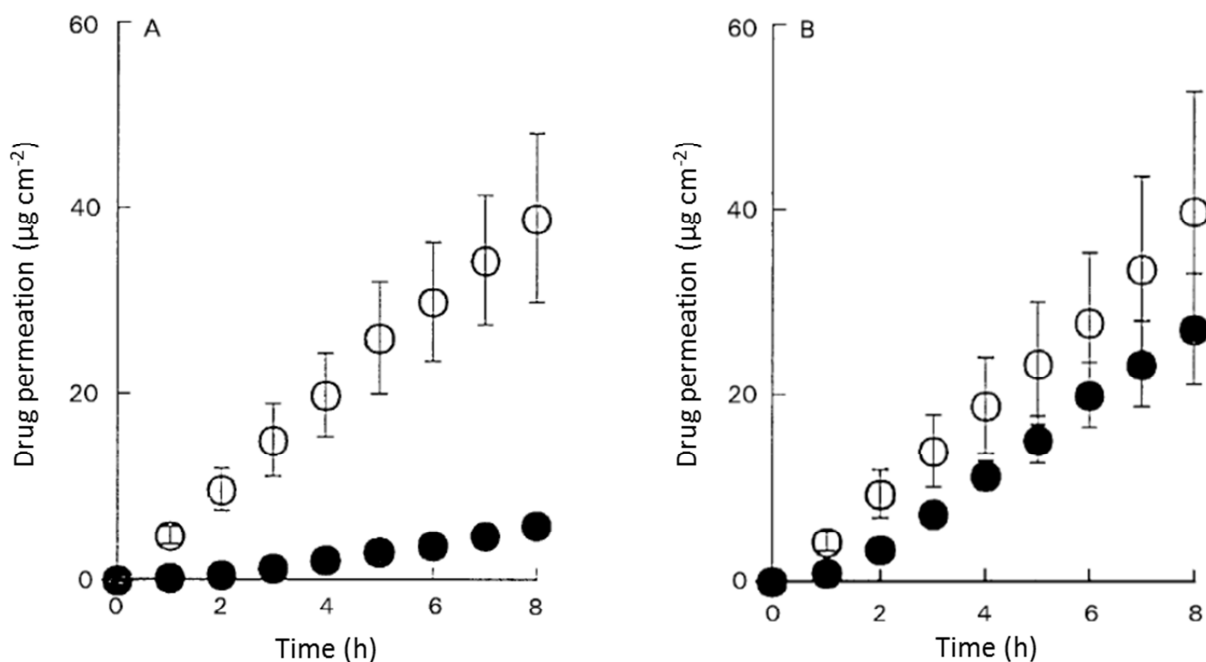
**Fig. 13** Effects of jet injector pretreatment on the permeation of angiotensin II through hairless rat skin. Control, ■; single jet injection 10 mm above the skin surface, ○. Each data point represents the mean  $\pm$  s.e.m. of 3-6 replicates.

次に、NFI と定電流イオントフォレシスの併用効果を評価した。Fig. 14B に 0.3 mA イオントフォレシスの NFI 前処理がある場合とない場合の皮膚を透過したアンジオテンシン II の累積透過量を示す。短いラグタイムの後の直線関係がジクロフェナクのイオントフォレシス透過と同様に観察された。NFI 前処理がある場合と前処理がない場合の定電流イオントフォレシス実施中、定常状態フラックスは両者の間で有意差は認められなかった (Table 6)。なお、NFI 前処理はラグタイムのみ減少させた。

**Table 6.** Effects of different types of jet injector and iontophoresis treatment on the permeation parameters of angiotensin II ( steady-state flux (Jss) and lag time) through hairless rat skin and electrical parameters (potential difference (Vss) , electric current (Iss) and membrane resistance (Rss)) at steady state.

	Jss ( $\mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$ )	Lag time (h)	Vss (V)	Iss (mA)	Rss ( $\Omega$ )	Ref.
Control	$0.177 \pm 0.013$	$0.37 \pm 0.20$				Figure 13
$1 \times \text{JI}$ (10 mm)	$2.628 \pm 0.445$	$0.23 \pm 0.21$				
0.2 V IP	$0.878 \pm 0.093$	$1.52 \pm 0.15$	0.2	$0.068 \pm 0.028$	2.94	Figure 14
0.2 V IP + $1 \times \text{JI}$ (10 mm)	$4.868 \pm 1.178$	$-0.09 \pm 0.34$	0.2	$0.428 \pm 0.103$	0.47	
0.3 mA IP	$4.007 \pm 0.751$	$1.16 \pm 0.14$	$0.647 \pm 0.028$	0.3	2.16	
0.3 mA IP + $1 \times \text{JI}$ (10 mm)	$4.979 \pm 1.503$	$0.22 \pm 0.17$	$0.185 \pm 0.041$	0.3	0.62	

Each value represents the mean or the mean  $\pm$  s.e.m. of 3-6 replicates.  $n \times \text{JI}$  (a mm): n times jet injection (JI) set at a mm over the skin surface; IP; iontophoresis. Rss was calculated according to Ohm's law.



**Fig. 14** Combined effects of jet injector pretreatment and constant voltage and constant current iontophoresis on the permeation of angiotensin II through hairless rat skin. Constant voltage (0.2 V) (A) or constant current (0.3 mA) (B) iontophoresis alone, ●; single jet injection 10 mm above the skin surface with constant voltage (0.2 V) (A) or constant current (0.3 mA) (B) iontophoresis, ○. Each data point represents the mean  $\pm$  s.e.m. of 3-6 replicates.

### 第 3 節 考察

NFI の先端と皮膚表面との距離を変えることによって、NFI によって角層に形成される孔の大きさが変化すること<sup>36)</sup>は次章で説明する。注射した生理食塩液は、NFI の先端と皮膚表面の距離が 10 mm の場合、皮膚表面に接して (0 mm) 注射した場合よりも広い面積の浅い孔となり、その結果、角層に形成される孔はより大きなサイズとなった。顕微鏡での観察から、皮膚表面の孔の大きさは、距離が 0 mm の時と 10 mm の時、それぞれ  $0.1 \text{ mm}^2$  と  $0.3 \text{ mm}^2$  となることがわかった。これが Fig. 10 の二つのグループ間で皮膚透過性に差が出た理由であ

ると考えられる。そのため、以後の実験は透過性の高い処理である皮膚の上 10 mm から注射して実施した。

NFI によって生理食塩液を注射する前処理を行い、ジクロフェナクの皮膚透過量を測定したところ、NFI で前処理したグループは対照群（NFI 前処理なし）より短いラグタイムと高いみかけの定常状態フラックスを示した。NFI の前処理を 3 回行った場合に、そのフラックスが約 3 倍の値を示したので、ジクロフェナクの主な皮膚透過ルートは NFI で形成された孔であることと、生理食塩液による NFI の前処理は薬物の皮膚透過性を促進するのに役立つことが示唆された。

NFI 前処理とイオントフォレシスの併用効果の研究は、まず定電圧イオントフォレシスから評価した。事前の予備的観察から、NFI 単独の前処理と比較して 0.2 V イオントフォレシス単独の皮膚透過性が低かったため、0.5 V を選択した。

定常状態フラックスは、NFI 前処理がある場合とない場合のどちらのグループでも観察されなかった。これは、皮膚のバリア抵抗に段階的な減少が起こった可能性が考えられた。Fig. 11 の最後の 3 ポイントのみから計算した平均フラックスとラグタイムを Table 5 に示す。Fig. 11 に示すように、併用した場合の方が NFI 前処理のみ（Fig. 10）より透過性が高いことが明らかになったため、併用によるジクロフェナクの皮膚透過性に相乗効果が認められた。この相乗効果は、NFI によって形成された孔が、ジクロフェナクが皮膚を通る時の新しい透過ルートになったことと、主な皮膚バリアである角層の電気抵抗を減少させる役割があることによるものと考えられた。定電圧イオントフォレシス実施中、皮膚を通る電流値は NFI 前処理がある場合の方が、ない

場合に比べて大きかった。通常、電流は皮膚を通るジクロフェナクイオンを含む各イオンの原子価とフラックスの合計と比例する<sup>38)</sup>。このように定電圧イオントフォレシスを実施している間、オームの法則に従って電流とジクロフェナクのフラックスは増加し、皮膚バリアの電気抵抗は  $1.15 \text{ k}\Omega$  から  $0.72 \text{ k}\Omega$  へ減少した。

定電圧イオントフォレシス実施中、電流が徐々に増加したが、ジクロフェナクのフラックスと電流値の間に良い相関関係が得られたのは NFI 前処理がある場合、ない場合とも電流密度が  $0.5 \text{ mA/cm}^2$  以下であった。しかし、その関係は電流が  $0.5 \text{ mA/cm}^2$  より高くなると崩れた。この現象は、高い電流 ( $>0.5 \text{ mA/cm}^2$ ) で、皮膚バリアの integrity が減少し、皮膚に損傷を与えるという以前の報告<sup>39)</sup>によって説明されると考えられる。そのため、定電圧イオントフォレシスでは、透過実験は 4 時間で終了とした。

定電圧イオントフォレシスを実施している間、徐々に電流が増加するとともに薬物フラックスが徐々に増加することが観察されたが、この現象は皮膚への薬物送達のコントロールを困難にし、皮膚損傷の可能性も増加させる可能性があるため、より正確な薬物投与と皮膚刺激性軽減のために、定電流イオントフォレシスで NFI 前処理とイオントフォレシスの併用効果について検討した。

定電流イオントフォレシスにおいて、 $0.1 \text{ mA}$  イオントフォレシスでは NFI 前処理をした場合の方がフラックスは大きかったが、NFI 単独とほぼ同じフラックス (Fig. 10、Table 5) を示し、透過促進効果は観察されなかった。また、 $0.3 \text{ mA}$  イオントフォレシスと NFI の併用でも透過の促進は観察されなかった。しかし、NFI と定電流イオントフ

フォレシス（0.1 mA、0.3 mA 両方とも）の併用は、定電流イオントフォレシス単独（Table 5）に比べ、皮膚を通る電位差はより低いことが示された。このことから、NFI 前処理は化学的促進法を用いたイオントフォレシス同様、必要な電力を減少させる<sup>40)</sup>為に有用であると考えられた。

定電圧イオントフォレシス実施中、電流は時間とともに徐々に増加したため、特に長時間処置を行う場合は、定電流イオントフォレシスによる皮膚の損傷は定電圧イオントフォレシスと比較して、より低い可能性があると考えられた。

ジクロフェナクの次に、アンジオテンシン II をモデル薬物として実験を行った。アンジオテンシン II はジクロフェナクに比べて分子量は約 4 倍で、より水溶性が高い物質であるため、皮膚はほとんど透過しないと推測される。Clemessy 他（1995）は、アンジオテンシン II の溶液に皮膚上で 10 時間 0.5 mA を適用した後、HPLC（High Performance Liquid Chromatography）で測定したところ、アンジオテンシン II の分解物は見られなかったと報告している<sup>35)</sup>。さらに、トリチウム標識化アンジオテンシン II に電流を適用した後の TLC

（Thin-Layer Chromatography）で、放射能スポットの移動がないことが観察された。これらの結果から、イオントフォレシスで適用する電氣的条件ではアンジオテンシン II は化学的、放射化学的に安定性であることが確認された。

そこでまず、イオントフォレシスとの併用効果を見る前に、NFI 前処理のみの効果を検討した。その結果、NFI 前処理はアンジオテンシン II の皮膚透過を上昇させたため、親水性化合物の透過ルートを拡大

させて薬物の皮膚送達率を上昇させることが判明した。興味あることに、分子量の小さいジクロフェナクに比べて促進効果は大きく、NFI前処理はアンジオテンシンⅡのように比較的大きな分子量の物質で、皮膚透過性促進に有用であると思われた。

定電圧イオントフォレシスとNFI前処理の併用はイオントフォレシス単独よりも高いフラックスが得られ、アンジオテンシンⅡの送達でも相乗効果が観察された。また興味深いことに、透過プロファイルはイオントフォレシスのみとNFI併用のどちらも、ジクロフェナクの場合と異なり、短いラグタイムの後ほとんど直線を示した。また、定電圧イオントフォレシス実施中、ジクロフェナクの場合は、皮膚抵抗が時間とともに減少したが、アンジオテンシンⅡの場合では抵抗の減少は観察されなかった。定電圧イオントフォレシスを実施している間の電流の段階的な増加、または抵抗の段階的な減少は、特に小さな分子の薬物と内因性イオンの皮膚透過が段階的に増加することと関連があると考えられるが、これらの現象を解明するためには、様々な薬物を使用した皮膚透過実験が必要であろう。

#### 第4節 小括

NFIで形成した孔に薬物溶液を適用しイオントフォレシスを実施すると、注射器のピストンで溶液を皮膚内に押し込むように作用すると想定して併用実験を行い、両者の併用が相乗効果となって現れることが確認できた。NFI前処理と定電圧イオントフォレシスの処理は、両方ともジクロフェナクとアンジオテンシンⅡの皮膚透過量をコントロール（NFIなし、イオントフォレシスなし）に比べて上昇させた。ま

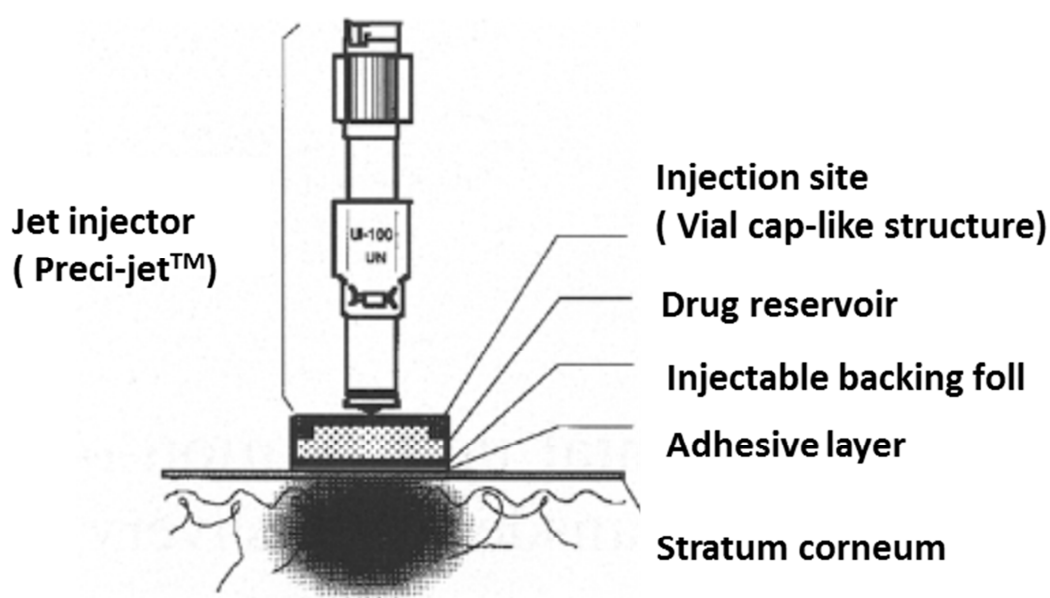


た、その併用は **NFI** 前処理単独あるいは定電圧イオントフォレシス単独より高いフラックスを示した。この透過促進効果は、**NFI** 前処理の後、皮膚抵抗が低下したことによって観察されたものと推測される。しかしながら、定電圧イオントフォレシス実施中、時間とともに電流が増加したことから、皮膚を透過する薬物の透過率をコントロールすることが困難になり、皮膚損傷を引き起こす可能性があると思われた。一方、**NFI** と定電流イオントフォレシスの併用ではイオントフォレシス単独または **NFI** 単独に比べて皮膚透過が常に高いわけではなかった。

以上の結果より、複数回の **NFI** 前処理を行って、短時間定電圧イオントフォレシスを行った後、定電流イオントフォレシスを実施する方法が、重篤な皮膚損傷を防止しながら薬物の透過を上げる最も良い方法であると思われた。

### 第 3 章 経皮吸収に無針注射器を組み合わせた新規薬物送達システムの基礎的研究

これまでの検討から、無針注射器（NFI：Needle-free injector）の処理は *in vitro* で経皮吸収促進効果があること、また、水溶性で高分子量の今まで送達が困難であった薬物の送達にも有用であることが判明した。そこで、この処理が *in vivo* でも治療効果が得られる程度に薬物を送達することができるのか、について検討する必要があると考えた。吸収促進剤の実験では、*in vitro* でのヒト皮膚の透過はラット皮膚より低く <sup>41)</sup>、*in vitro* 実験の結果は *in vivo* 挙動とは同じではないことが報告されている <sup>42)</sup>。



**Fig. 15** A novel drug delivery system: transdermal delivery system with jet injection.

NFI を使用する経皮投与方法として、現実的な投与方法を Fig. 15 のように想定した。この投与方法は、薬物を含む溶液を充填した貼付剤を皮膚に貼り、貼付剤の上から NFI で薬液を射出するものである。この時、薬液は貼付剤を貫通して皮膚に送達される。皮膚から直接血液中に送達された薬液は **loading dose** となるとみなされ、経皮吸収剤のみの適用よりも早い吸収を得ることが可能と想定され、このことは第 1 章の NFI 射出後の血中濃度測定の結果からも示唆されている。貼付剤の上部の蓋はバイアルのゴム栓と同じ構造であるため、貫通と同時に孔は閉鎖されるため、貼付したまま日常生活を送ることが可能である。貼付剤の皮膚に接する部分は小孔が形成されたままであるため、持続的に皮膚中に薬液が供給され、一定の血中濃度が維持されるシステムである。

このような NFI を併用する薬物送達システム作成の最初のステップとして、(1) 孔を通して、薬物は有効血中濃度を維持できる量で送達できるのか。(2) 処理方法を変えることによって孔からの透過性を調節することができるか。そして (3) どのくらいの期間このシステムで継続投与が行えるのか、について検討した。

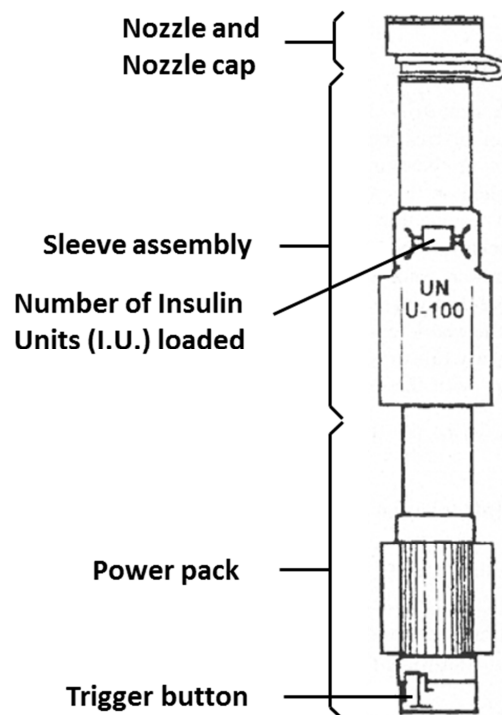
今回の検討では、経皮送達量を正確に見積もるために、NFI には薬液を充填せず生理食塩液を使用し、皮膚に小孔を形成するためだけに使用した。

## 第 1 節 実験方法

### 1. 無針注射器 (Preci-Jet™, NFI : Needle-free injector)

プレシジェットおよびメディジェクター (メディジェクトコーポレ

ーション、ミネアポリス、MN、米国)は噴射式注射器である。実験で使用したプレシジェット (NFI) (Fig. 16) は、小玉薬品工業 (東京 ; 現・ノボ・ノルディスク) によって供与された。この装置は **Advanced Medical Technologies** 社 (カナダ) によって、無針でインシュリンの自己注射をするために開発された。NFI の高い圧力を利用し、インシュリン注射液は皮膚を突き通して、皮下組織に送達される。この報告では、前述のように皮膚に孔を開けるために使用するため、生理的食塩液を使用した。



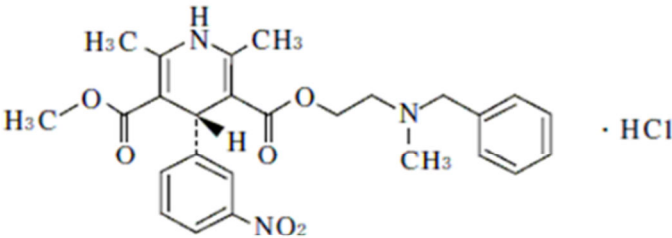
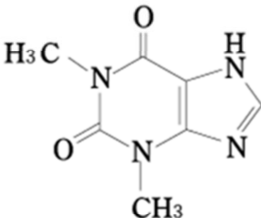
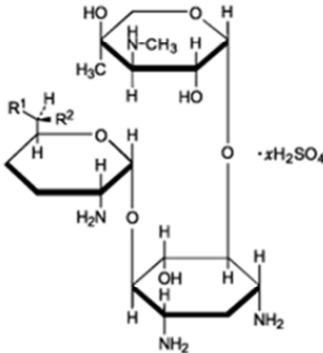
**Fig. 16** Typical diagram of Preci-Jet™.

## 2. 実験材料

ゲンタマイシン硫酸塩 (GM、生化学等級) は、和光純薬工業社 (大阪) から購入した。テオフィリン (TP) は水に対する溶解性が低いた

め、アミノフィリン（テオフィリン・エチレンジアミン、TP の 92.6% として定量(局方品))を代わりに使用した。ニカルジピン塩酸塩(NC)は、日産化学工業（東京）から供与された。YC-204（NC 定量のための内部標準物質）は、山之内製薬（東京、現・アステラス製薬株式会社）によって供与された。他の試薬は、分析用、または HPLC 用を用いた。Table 7 にニカルジピン塩酸塩、テオフィリンおよびゲンタマイシン硫酸塩の構造と分子量を示す。

**Table 7** Chemical structures and physicochemical properties of model compounds

	Structure	M. W.
Nicardipine Hydrochloride (NC)		515.99
Theophylline (TP)		180.16
Gentamicin sulfate (GM)	 <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="margin-right: 10px;"> <math>C_1; R_1=CH_3, R_2=NHCH_3</math>  <math>C_2; R_1=CH_3, R_2=NH_2</math>  <math>C_3; R_1=H, R_2=NH_2</math> </div> </div>	$C_1$ : 477 $C_2$ : 463 $C_3$ : 449

### 3. 実験動物

雄の WBN/ILA-Ht ヘアレスラット（平均体重 250 g、石川実験動物研究所、埼玉）を、すべての動物実験で使用した。

### 4. 静注実験

消失パラメータを求めるために、3つのモデル薬物をラットに静脈投与した。投与量を Table 8 に示す。薬液をそれぞれ頸静脈に注射し、血液サンプル (300  $\mu$ L) は、所定の時間に対側の頸静脈より採血した。NCを使用した時は、バイアルおよび注射器への吸着を防ぐために 10% エタノール溶液を溶媒に加えた。

**Table 8** Conditions for administration of each drug.

	I.v. injection		Topical application	
	Concentration	Dose	Concentration	Volume
GM	0.1% in water	1.0 mg/kg	30% in water	1.0 mL
	0.5% in water	5.0 mg/kg		
TP	0.5% in water	5 mg/kg	9.26% in water (pH 9.3)	1.0 mL
	1.0% in water	15 mg/g		
NC	0.05% in 10% EtOH	0.5 mg/kg	20% in 10% EtOH	1.0 mL
	0.3% in 10% EtOH	3.0 mg/kg		

### 5. *In vivo* 透過実験

ラットは、固定板に背位固定した。皮下組織が比較的厚い臀部を適用部位として選択した。テフロン製の円筒のシリンダー（内径= 13 mm）がある場合とない場合で、NFI から皮膚に生理食塩液（60  $\mu$ L）のみを最も低い注射圧（6 単位-バックオフ）で射出した。適用した溶液を

Table 8 に示した。皮膚表面と射出距離が離れている場合は、速やかに薬液を適用するために、射出前に円筒をアロンアルファ®（三共株式会社、東京、現・第一三共株式会社）で臀部の皮膚に貼り付けた。

薬液（1 mL）を円筒に満たし、すぐに円筒をキャップで覆った。薬液が常に皮膚と接触しているように、ラットの背中を上にした状態で固定した。NFI 先端と皮膚表面を接触させて射出する場合は、生理食塩液を浸した濾紙（直径 5 mm）を NFI 処置直後に皮膚に貼り付けた後、円筒を皮膚に貼り付け、濾紙を除去した後、薬液を適用した。NFI 未処置の透過実験を比較のために行った。薬物の透過性に対する皮膚と NFI 先端部の距離（3.4、4.2、7.7、9.5 mm）の影響は、円筒の高さを変えることによって血中濃度を測定した。血液サンプル（300  $\mu$ L）は、経時的に頸静脈から採血した。

## 6. 皮膚の形態学的観察

*In vivo* 透過実験の後、皮膚の注射領域を、ペントバルビタールナトリウム（ダイナボット株式会社、大阪（現・アボットジャパン、東京）50 mg/kg、*i.p.*）で麻酔し摘出した。皮膚サンプルを 20%のホルマリンに浸漬した後に、ヘマトキシリン・エオジン法で染色し、マイクロトームで切片にし、顕微鏡下で観察した。

## 7. *In vitro* 透過実験

NFI 先端と皮膚面が 0 または 5 mm の距離で、NFI をラット臀部に使用した。処理した部位をペントバルビタールナトリウム麻酔下摘出した。摘出した皮膚切片は、有効拡散面積 0.95 cm<sup>2</sup> の縦型拡散セルに

表皮側を上にもウントした<sup>43)</sup>。ウォータージャケット付セルは 37 °C の水浴に接続した。レシーバーの容量は 4.5 mL で、水で満たした。*In vivo* 透過実験と同じ円筒をドナー・コンパートメントとして使用し、クランプで固定した。ドナー・コンパートメントは、3%の GM 溶液で満たした。経時的にレシーバー液をサンプリングし、同量の水を補充した。サンプリング量は、シンク状態を維持できるように調整した<sup>44)</sup>。*In vitro* の透過実験は、上記の 2 つの方法の NFI 処置 (0 または 5 mm) の後、テープで皮膚をストリプト (20 回)<sup>45)</sup>し、角層を除去して同様に行った。

## 8. 分析

GM と TP は、TDX<sup>TM</sup> システム (アボット社、東京) を使用して分析した。NC は、小林の方法 (1987)<sup>46)</sup>にしたがって測定した。

## 9. 皮膚吸収率の推定

静注後の血中濃度推移は、MULTI を使って分析した (アルゴリズム; ガウス-ニュートン方法)<sup>47)</sup>。体循環へのドナー・コンパートメントからの薬の生体内吸収速度は、Convolution and Deconvolution プログラム (TTS Technology、坂戸、埼玉)<sup>48)</sup>を用いた。

## 10. NFI 処理後角層に形成された穴の面積の測定

NFI 処置の後、アロンアルファ<sup>®</sup>を孔に注いだ。孔の鋳型を取って顕微鏡下で測定した。

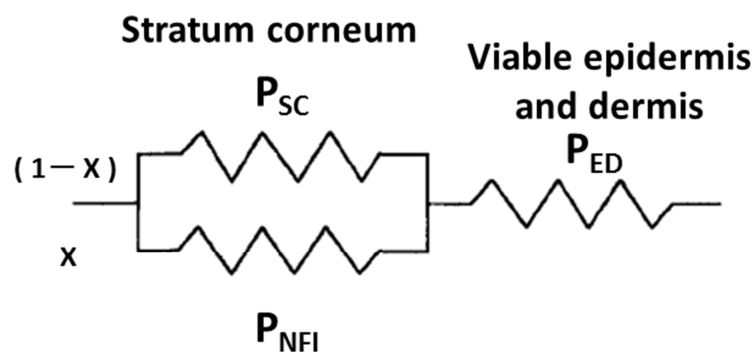


### 1 1 . 1 週間の *in vivo* 透過実験

NFI 処理皮膚を用いた方法の持続性を観察するために、一週間にわたって *in vivo* 透過実験を行った。テフロン・シリンダーは、ゴム・タイプの接着剤（ボンド G クリア®、コニシ社、大阪）を使用して皮膚に貼付した。ホールディングケージの中で通常の餌で飼育したラットに 10% のアミノフィリン溶液（pH 9.3（TP として 9.26%））を適用した。血液は、24 時間おきにサンプリングした。

## 第 2 節 理論

NFI 前処理皮膚の薬物透過率は、Fig. 17 で示されるモデルに基づいて、式 3 から計算することができる：



**Fig. 17** A model showing drug permeation through skin pretreated by jet injection.

$$P_T = [(1-X)P_{SC} + XP_{NFI}] \times P_{ED} / [(1-X)P_{SC} + XP_{NFI} + P_{ED}] \quad (3)$$

ここで、 $P$  は透過係数 (cm/s)、 $X$  は角層の中の孔の面積比率を示す。添え字の  $T$ 、 $SC$ 、 $NFI$  と  $ED$  はそれぞれ皮膚全層、角層、無針注射器、

生きた表皮および真皮を意味する。NFI 処置なしで GM の透過は観察されなかったので、式 3 の  $P_{sc}$  はゼロとなることから、方程式は以下のようになる。

$$P_T = (XP_{NFI}P_{ED}) / (XP_{NFI} + P_{ED}) \quad (4)$$

### 第 3 節 結果

#### 1. NFI 処理皮膚を通した薬物の透過

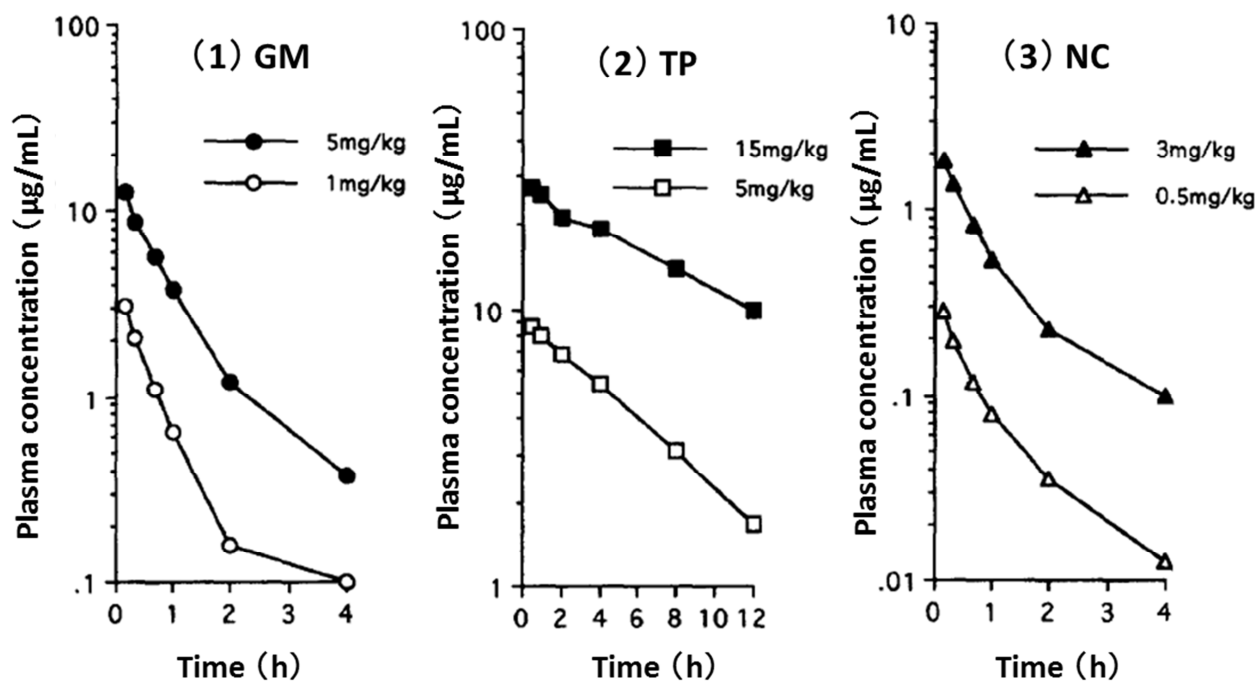
Fig. 18 に、静脈注射後の各々の薬物の血中濃度推移を示す。GM と NC は線形 2-コンパートメント・モデルで、TP は線形 1-コンパートメント・モデルで解析した。使用したどの薬物も使用した濃度で濃度依存性は観察されなかった。

式では、血中濃度 ( $C_p$ 、 $\mu\text{g/ml}$ )、時間 ( $t$ 、 $\text{h}$ )、静脈内投与量  $D$  ( $\text{mg/kg}$ ) である。

$$\text{GM: } C_p = D(2.94e^{-9.38t} + 2.85e^{-1.16t})$$

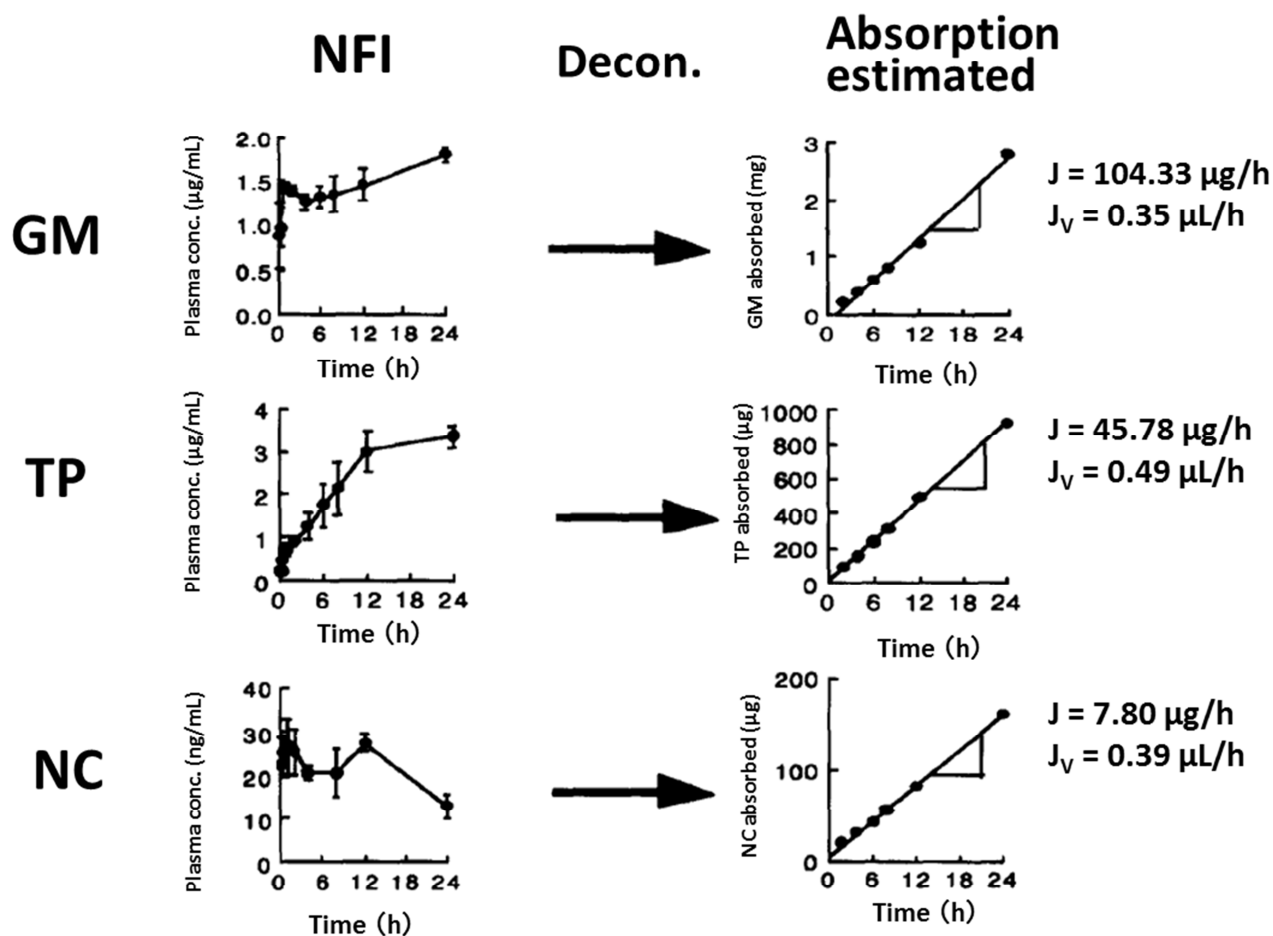
$$\text{TP: } C_p = D(1.67e^{-0.09t})$$

$$\text{NC: } C_p = D(0.69e^{-2.28t} + 0.16e^{-0.42t})$$



**Fig. 18** Time course of plasma concentration of model drugs after intravenous injection.

Fig. 19 は、deconvolution によって得られた薬物の累積透過量を示す。図中の線の傾きは透過率（または吸収率）である。この値は薬物ごとに異なったが、適用濃度で除して経皮 volume flow（溶媒流）とすると、薬物によらずほとんど同じ値を示した ( $0.41 \pm 0.041 \mu\text{L/h}$ )。

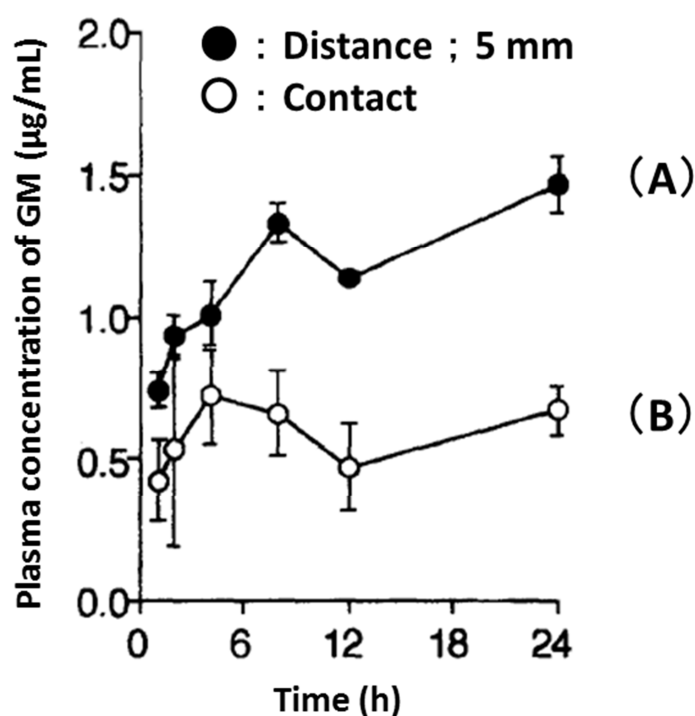


**Fig. 19** Time course of plasma concentration of model drugs after topical application with NFI treatment (left) and cumulative amount of skin permeation of model drugs calculated by deconvolution method (right) after application with NFI treatment. Slope of the regression line means the permeation rate.

## 2. NFI 処理の変更による薬物透過性の変化

この送達方法による薬物の血中濃度が、NFI の先端部と皮膚表面の間の距離で異なることが事前の実験から観察されていた。そこで、*In vivo* 透過実験を異なる NFI 前処理で行った。すなわち、一方は NFI 先端部と皮膚面の間で 5 mm の間隔を空け (A)、また、もう一方は間隔を空けずに行った (B)。30% の GM 溶液を NFI で前処理した皮膚に

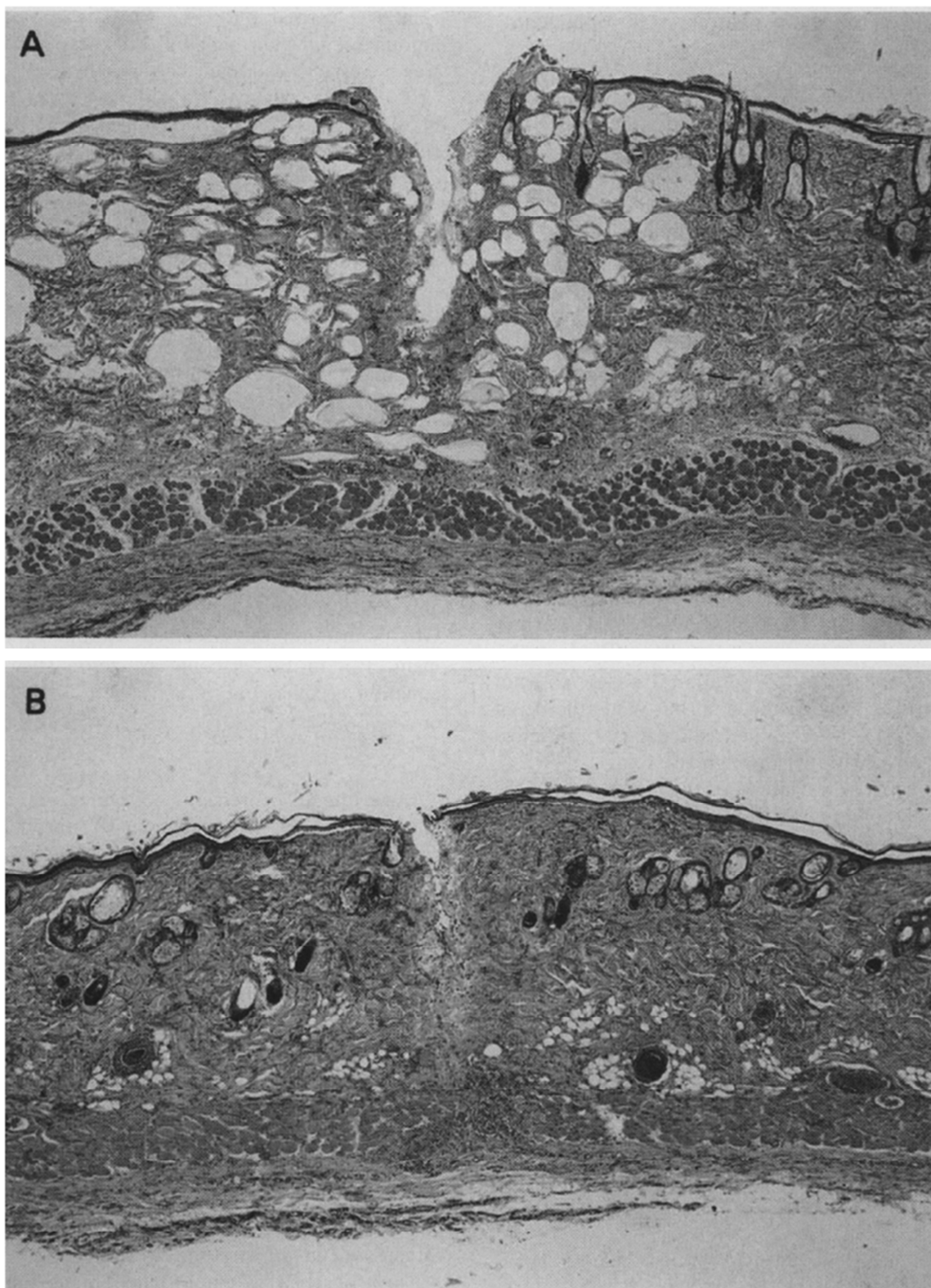
適用した。Fig. 20 に GM の血中濃度時間曲線から前処理の効果を示す。処置(A)は、(B)より高い血中濃度を示した。deconvolution によって計算された溶媒流は、処置(A)と(B)でそれぞれ  $0.29 \pm 0.02 \mu\text{L/h}$ 、および  $0.143 \pm 0.034 \mu\text{L/h}$  であった。処置(A)は、(B)より 2 倍高い透過率が得られた。



**Fig. 20** Plasma concentration of GM after topical application to NFI pretreated skin.

### 3. NFI 処理の変更による皮膚状態の変化

(A)および (B) の処置が溶媒流に与える影響を調べるために、皮膚切片を顕微鏡で観察した (Fig. 21)。処置(A)は角層で (B)より大きな孔を形成し、射出された溶液 (生理食塩液) は皮膚を貫通せず、皮膚中でデポを形成していた。一方、処置(B)において射出された溶液は皮膚を貫通していた。



**Fig. 21** Microscopic observation of skin after two types of pre-treatment. Saline was injected by NFI with 5 mm away (A) or 0 distance (B).

#### 4. NFI 処理による皮膚状態変化の透過性への寄与の評価

角層のより大きな孔と皮膚中のデポ形成の2つの皮膚変化はどちらも処置(A)のより高い透過性を示す原因の可能性があると考えられたため、各々の変化の寄与を評価した。すなわち、*In vivo*で処置(A)または(B)をした後、そのままの(全層)皮膚、または角層を除去した皮膚で *in vitro* 透過実験を行った (Fig. 22)。

処置(A)の皮膚全層での GM の累積透過量は処置 (B) の約 10 倍に上昇した (Fig. 22 (左)) が、角層を除去した皮膚では(A)と(B)の間で差は見られなかった (Fig. 22 (右))。

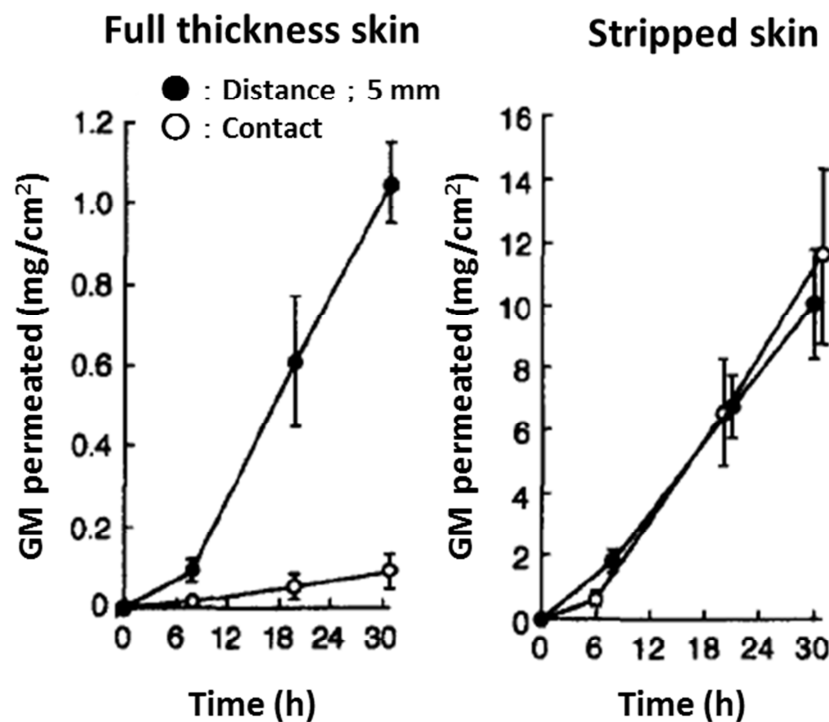


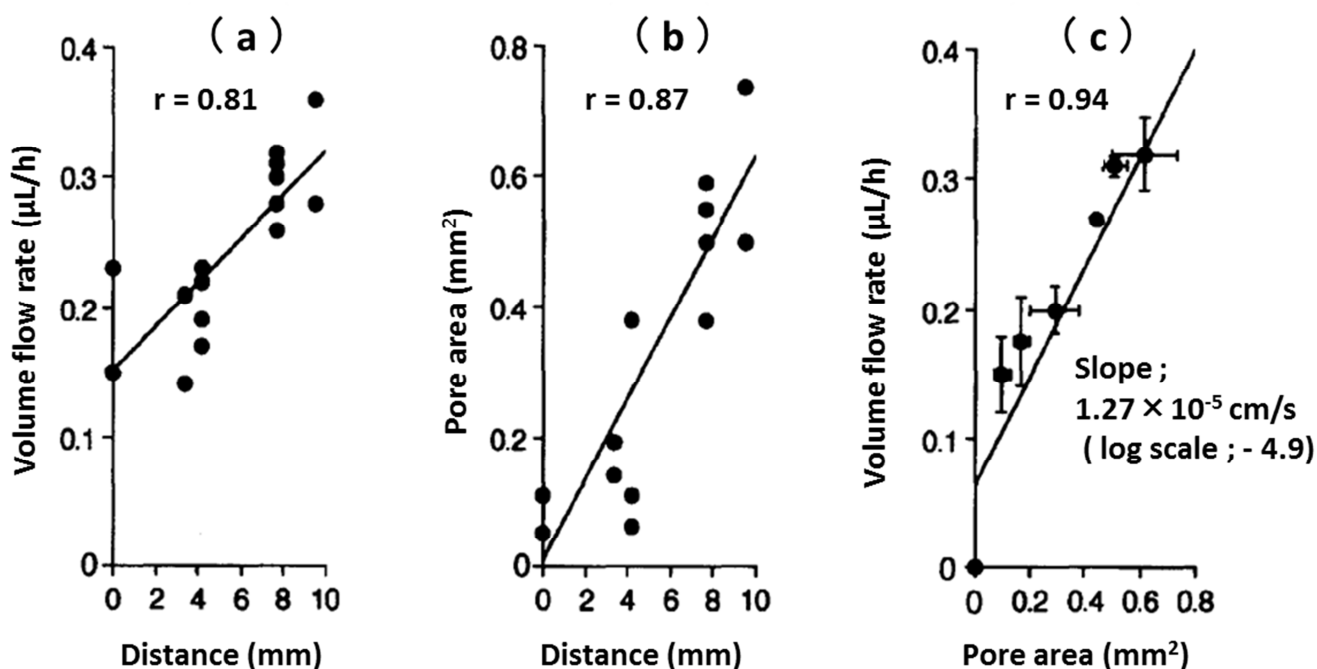
Fig. 22 In vitro permeation of GM through full thickness or stripped skin pretreated with NFI.

#### 5. NFI 処理の距離の違いと透過性についての評価

皮膚表面と先端の距離、角層の孔のサイズ、および皮膚透過性との

関係を明らかにするために、NFI 先端部から皮膚表面までの距離を、0 から 9.5 mm にわたって NFI 処置を行った後、*in vivo* 透過実験を 30%GM 溶液を使って行った。

Fig. 23a、b および c はそれぞれ、距離と volume flow rate(溶媒流)、距離と孔のサイズそして、孔のサイズと volume flow rate の関係を示す。Fig. 23 から、距離が孔の大きさを決定し、孔の大きさに volume flow rate が依存することが判明した。



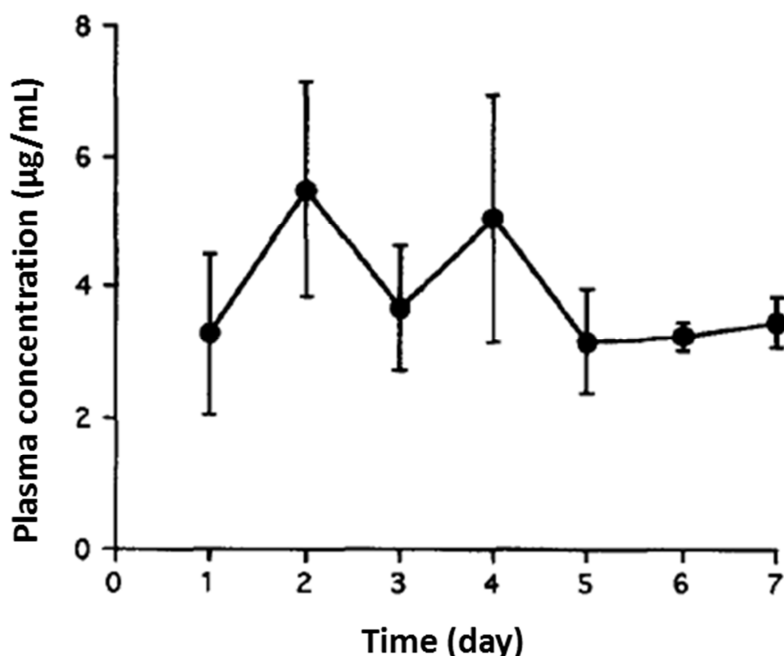
**Fig. 23** Correlations between volume flow rate and skin-Jet injection distance (a), pore area and the distance (b) and the flow rate and pore area (c).

## 6. NFI 処理と経皮吸収の継続性の評価

数日にわたる薬物投与を想定し、この薬物送達方法の継続性について検討した。NFI 処理の後、TP 溶液を皮膚に適用し (Table 8)、デバイスを取ることができないように、ラットをホールディングケージに



入れた。Fig. 24 に 1 週間に亘って測定した TP の血中濃度を示す。少しの変動はあったが、TP の血中濃度は 1 週間にわたって持続した。



**Fig. 24** Plasma concentration of TP during a week-long application.

#### 第 4 節 考察

3 種類のモデル薬物 (GM、TP、NC) は臨床で良く使用されている薬物で、分子量は 400~700 程度であるが、比較的水に溶解しやすい薬物 (TP はアミノフィリンを使用) である。この溶液は皮膚に適用しても、皮膚を透過して全身循環系には移行しない。これは、NFI 前処理実験の前に、NFI 前処理なしで溶液を局所に適用した場合、モデル薬物が血中に出現しなかったことで確認された。しかし、前処理を行った (NFI 先端と皮膚の間を 10 mm の距離で射出した) 場合、薬物は全て血液中出现した (Fig. 19)。NFI 前処理をした後、NFI で形成された孔を接着剤であるアロンアルファ®によってふさいだ場合、

血液中に薬物は出現しなかった。このことから、NFI 処理によって新しい薬物の皮膚透過ルートが作られたことが確認された。

累積透過量から透過率を求めて、それを各薬物の適用濃度で除した値が  $0.41 \pm 0.041 \mu\text{L/h}$  と一定になったことにより、NFI によって形成された透過ルートで薬物が送達される仕組みは **solvent drag** であると考えられた<sup>49)</sup>。この理論で、50%の薬液を適用すると、1 日あたりおよそ 5 mg の薬物を送達できると計算することが可能である。内服薬や注射剤で 1 日量が 5 mg 未満である薬物は少なくないため、この投与方法は有用な方法であると思われた。ただし実用化には、適用溶液の浸透圧などによる送達速度の変動や、溶液の皮膚への刺激性、さらに薬物を高濃度に溶解させる不活性な溶媒の選択などが課題になると考えられる。

NFI 処理の変更 (5 mm 間隔を開けるか、皮膚と接触させるか) によって薬物の透過性が変化し、皮膚の状態が変化 (孔の大きさ、皮膚内の生食によるデポ形成) したが、両者の皮膚変化の寄与を *in vitro* 透過実験で検討した結果、NFI 処置によって作られる角層の孔の面積が透過性増大の主要な原因であることが判明した。この時、皮膚中のデポの形成はほとんど寄与しなかった。なお、このことは、電気抵抗モデルを基にした式 3 および 4 から透過係数を算出して導いた。処理 (A) (5 mm 間隔) の皮膚全層と角層を除去した皮膚の *in vitro* での GM の透過係数を対数で表すと、それぞれ、 $-6.51$  と  $-5.38$  であった。一方、処理 (B) (間隔なし) では、それぞれ、 $-7.38$  と  $-5.37$  であった。式 4 を使用すると、処置 (A) と (B) の  $XP_{NFI}$  は、それぞれ  $-6.47$  と  $-7.38$  で、処置 (A) でおよそ 8 倍高いことが示された。

この実験で  $XP_{NFI}$  は  $P_{ED}$  に比べて非常に小さいので、式 4 で  $P_T$  は  $XP_{NFI}$  とほぼ等しくなる。 $P_{NFI}$  は、孔を通るルートの透過係数であると推測されるので、 $P_{NFI}$  は処置(A)と(B)で同じになることから、2つの処置の透過性の違いは孔の面積 ( $X$ ) によって説明され、角層に大きな孔を開けることによってより高い透過性が得られたことが示唆された。

距離と volume flow rate と孔の大きさの関係を調べた結果から、距離が孔の大きさを決定し、孔の大きさに volume flow rate が依存していることが判明し、この結果から、透過速度は NFI の処理をする距離によってコントロールできることがわかった。これは、距離を開けることによって NFI から射出された溶液が広がり、これによってより大きな孔が角層に形成されるのではないかと推測された。このことを確認するためには、NFI から射出される容量または圧力の制御に関する更なる検討が必要であると考えられた。

Volume flow rate と孔の大きさの関係を示した Fig. 23c 中の回帰直線の傾斜は、透過係数 (volume flow rate /面積比) とみなすことができ<sup>50)</sup>、 $1.27 \times 10^{-5}$  cm/s と算出することができる。この値は、報告されているヘアレスラットのストリプトスキンでの透過係数とほぼ同じである<sup>51,52)</sup>ことから、NFI による処理は、小さい面積のストリプトスキンを作る侵襲性の低い実用的な方法とみなすことができると思われる。

1 週間に亘る継続性を検討した実験からは、NFI 前処理と経皮吸収を組み合わせた送達方法の長期間にわたる適用の可能性が示唆された。

## 第 5 節 小括

NFI 前処理皮膚から *in vivo* で水溶性の 3 種モデル薬物を全身循環系に送達することができた。この薬物送達は、形成された小孔を通しての溶媒流によるものと考えることが可能であり、その送達量 0.4  $\mu\text{L/h}$  は、50%溶液で 1 日当たり 5 mg の薬物を送達することができる と推察された。また、NFI 先端と皮膚表面の距離を変えることによって、角層に形成される小孔の大きさをコントロールすることでき、これにより薬物送達量のコントロールが可能であると示唆された。また、1 週間にわたるデバイスの貼付実験から、この投与方法が持続性のあるものであることが判明した。以上、この基礎的研究から NFI で前処理をした皮膚を使用して行う薬物送達方法は、新しいタイプの薬物送達システムであると考えられ、このシステムは水のように不活性な溶媒に溶解する幅広い薬物に適用可能であると思われた。

## 結 論

本研究では、物理的な経皮吸収促進法としての無針注射器（NFI）の可能性について検討を行った。

NFI は針のない皮下注射用注射器で、バネの力を利用して水圧で液体の薬剤を皮下に送達する **liquid injector** と、高圧のガスで粉体の薬剤を皮下に送達する **powder injector** がある。今回使用した NFI は前者の **liquid injector** である。NFI は皮下注射用の医療機器として既に使用されているにもかかわらず、注射器という概念で使用されているため、射出された薬液の皮内分布や皮内動態、全身循環系への移行メカニズムなど不明な点が多い。NFI を皮膚からの薬物投与促進手段と位置付けるために、まずその性能を調査した。NFI のバネ力や射出口の角度を変更して、射出圧の測定や薬液の分布状況などを観察した結果、送達深度のコントロールができることが示唆された。また、送達深度によって、皮膚からの放出速度に差があることから、全身投与と局所投与の両方の可能性が見出された。また、他の経皮吸収促進法との併用の可能性を調べるために、既に物理的経皮吸収促進法として使用されているイオントフォレシスと併用し、併用する場合の NFI 処理とイオントフォレシス実施方法の最適化について知見を得ることができた。さらに、薬液の入ったデバイスの上から NFI を射出して経皮的に薬物を送達するシステムの可能性を検討するため、*in vivo* で各種薬物を適用して血中濃度測定を行い、実用化の可能性を検討した。

以下、得られた結果について要約する。

## 第 1 章の結論 無針注射器による皮膚への薬物送達の効果と可能性

NFI としてシマジェット®を使用し、市販の製品（NFI-s：強バネ、15 N/mm）とバネ力を弱くした製品（NFI-w：弱バネ、10.6 N/mm）、および射出口を 45° にしたノズルで、容量を変更して射出実験をおこなった。バネ力が異なっても、最大射出力は 100  $\mu$ L で得られること、皮膚に送達される薬液は、NFI-w で皮膚の浅い部分に、NFI-s では真皮に大部分が送達されることが観察され、NFI-w は表皮に選択的に薬物を送達することが示された。角度を変更したノズルでは NFI-s を使用して真皮に大部分が送達されるが、射出力が弱く送達される薬液が少ないため、送達量を増加させることが今後の課題であると判明した。NFI から射出された溶液の、皮膚からの薬物放出は拡散方程式から導かれた式 ( $Q = kt^n$ ) で解析した。放出実験から NFI-w では  $k: 1.18 \text{ h}^{-1}$ 、 $n: 0.7$ 、NFI-s では  $k: 10.5 \text{ h}^{-1}$ 、 $n: 0.5$  となり、NFI-w は放出が非常に遅く、その放出プロファイルは拡散制御型で、NFI-s は Fick の拡散に従う膜制御型の放出を示すことがわかった。放出実験後の皮膚中の薬物濃度は、NFI-s で大きく減少していたが NFI-w ではあまり変化がなく、薬液の分布によって皮膚内の薬物保持時間が異なることが示された。また、溶液に皮膚透過促進剤（ピロチオデカン）を O/W 型乳濁液として添加した場合、 $k$  は  $0.78 \text{ h}^{-1}$  となり、表皮での保持時間が延長し、皮膚からの放出率が低下したことから、局所作用を目的とした製剤への応用の可能性が示唆された。NFI から皮膚に射出された溶液の全身循環系への移行を観察するために、血漿中濃度の測定を行った。NFI を使用した皮下注で得られた血漿中濃度を *in vitro* の結果からシミュレーションした値と比較した結果、特に射出直後に大きな差

が生じたが、静注の結果とシミュレーション値を合計すると実測値と近似するため、NFIによる投与は、皮膚に分布してから吸収されるものと、直接血管床に吸収されるものがあることが明らかになった。以上より、NFIはバネ力の調節と射出口の角度の変更により、全身作用を目的とするか、局所作用を目的とするかをコントロールすることが可能で、注射の即効性と経皮投与の持続性を持つ新しい薬物送達手段として有用であることが示された。

## 第2章の結論 ジクロフェナクとアンジオテンシンⅡの *in vitro* 皮膚透過性に対するイオントフォoresisと無針注射器の相乗効果

注射針で角層に孔を開ける行為をNFI処理とみなし、注射器のピストンで皮内に薬液を挿入する行為を、物理的経皮吸収促進法の1つで電気を使用するイオントフォoresis (IP)で行うことを想定し、IPとNFIの併用効果について検討した。IPは電気泳動の原理で皮膚に貼付したデバイスから皮膚中へ薬物を導入する方法であるが、電荷を持たない物質も水の流れによって皮内へ送達されるため、水溶性の物質を送達することが可能である。モデル薬物にジクロフェナクを使用して *in vitro* 透過実験を行った場合、NFIによって形成された小孔からの透過はコントロールと比較して1回の処理で13倍に、3回の処理で37倍となり、NFIによって形成された小孔が新たな透過ルートとなることが確認された。IPとNFI前処理の実験で、0.5 V定電圧IPを実施したところ、NFI処理がある場合は、ない場合と比べて、4時間で3倍の累積透過量を示したことから相乗効果があることが確認された。しかし、時間とともに角層の電気抵抗が低下して電流が流れやすくな

り、これに伴って透過量も増加し、定常状態に達しないことから、投与速度のコントロールが困難なことから、電流値が  $0.5 \text{ mA/cm}^2$  以上になると皮膚の損傷が起こり、正常な皮膚機能を保てなくなることが判明した。また、定電流 IP では  $0.1 \text{ mA}$  と  $0.3 \text{ mA}$  で実験を行い、NFI と IP の併用効果は認められなかったが、NFI 前処理は化学的促進法と同様に必要電力を低下させることが明らかとなった。また、モデル薬物に高分子化合物のアンジオテンシン II を使用して実験したところ、 $0.2 \text{ V}$  の定電圧 IP でジクロフェナクと同様に相乗効果が認められたが、時間の経過とともに電流値が増加する状態は観察されなかった。このことは、低分子で電荷を持つジクロフェナクの場合、IP の実施で内因性イオンの皮膚透過が時間とともに増加することに関連していると推測されるが、詳細の解明には多様な分子での測定が必要であると思われる。また、アンジオテンシン II を使用して定電流 IP で実験した結果は、ジクロフェナクと同様に併用効果は認められず、ラグタイムの短縮のみ観察された。以上から、NFI 前処理と IP の併用は、複数回の NFI 前処理によって皮膚の透過抵抗を低下させ、短時間で定電圧 IP を実施した後、定電流 IP に切り替える方法が、皮膚の損傷を抑えながら薬物透過量を上げて、さらに薬物投与速度をコントロールする最も良い方法であると思われる。

### 第 3 章の結論 経皮吸収に無針注射器を組み合わせた新規薬物送達システムの基礎的研究

薬液を充填した経皮吸収製剤のデバイスを皮膚に貼付した上から、NFI で薬液を射出し、射出した溶液を loading dose として、デバイス



から供給される薬液で一定の血中濃度を維持させる新規薬物送達システムを想定し、その可能性を検討した。この送達方法が治療に必要な薬物量を送達できるかを確認するために、各種薬物を使用した実験をまず *in vivo* で実施した。また、この研究では、デバイスからの薬物送達量を明確にすることを目的とし、NFI は薬物を含有しない生理食塩液を充填し、小孔形成のためだけに使用した。ゲンタマイシン硫酸塩 (GM)、テオフィリン (TP)、ニカルジピン塩酸塩 (NC) をモデル薬物として実験し、NFI 処理をしない皮膚では血漿中に薬物は出現しなかったが、NFI 処理をした皮膚からは 3 種類の薬物が血漿中に移行した。

この薬物送達量を適用濃度で除して経皮 volume flow (溶媒流) とすると、薬物によらず  $0.4 \mu\text{L/h}$  となり、NFI によって形成された透過ルートで薬物が送達される仕組みは solvent drag と考えられた。このことから、50% 溶液を適用すると、1 日約 5 mg の薬物を送達することが可能になり、有用な投与方法であると考えられた。この薬物送達方法では、NFI 処理を行う際の NFI 先端と皮膚表面の距離によって薬物送達量が異なり、5 mm の間隔を空けて処理した場合は、0 mm に比べ 2 倍の透過速度を示した。NFI 処理時の距離の変更により、角層に形成される孔の大きさと、皮膚内に形成される生理食塩液のデポの有無が変化することから、両者の寄与を 2 つの処理方法の後、角層を除去した状態と角層を残した状態とで *in vitro* 透過実験を実施した。その結果、皮膚に形成された小孔の大きさが透過に寄与することが判明した。小孔の大きさと NFI 処理の距離、透過性の 3 者の関係を調べるために、NFI 処理の距離を変更して実験し、透過速度は処理する距離を

変更することによってコントロールできることが明らかになった。また、この NFI 処理と経皮吸収製剤の組み合わせの継続性を調査したところ、1 週間にわたって血漿中濃度が持続したことから、長期投与の可能性が示唆された。

第 1 章および第 3 章の結果から、第 3 章で考案した、薬液充填デバイスの上から NFI で薬液を射出する製剤は、NFI-s を選択した場合、素早く全身に薬物を送達し、デバイスからの薬液の供給が 24 時間以上持続することが推測された。また、NFI-w を選択した場合は、局所へ留まる剤形を選択することによって、局所投与製剤となり、デバイスからの薬液の供給で高濃度の状態を持続させることも可能と考えられた。さらに、第 2 章の結果から、イオントフォoresis を併用することで投与速度のコントロールや ON-OFF が可能となり、日内変動に合わせた投与速度の変更などが可能と考えられ、これらの結果を総合すると、臨床で使われる幅広い薬物に最適な投与方法が行える可能性があることが示唆された。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に際して終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学病院薬剤学研究室教授 森本雍憲 先生ならびに城西大学薬粧品動態制御学研究室教授 杉林堅次 先生に感謝の意を表します。

また、埼玉医科大学総合医療センターにおいて本研究の機会を与えていただき、ご指導賜りました城西大学招聘教授 木村昌行 先生（前：埼玉医科大学総合医療センター薬剤部長）に感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行にあたり、終始有益なご指導、ご助言を賜りました城西大学薬剤作用解析学研究室教授 小林大介 先生ならびに城西国際大学薬学部准教授 長谷川哲也 先生 ならびに城西大学薬粧品動態制御学研究室准教授 藤堂浩明 先生に感謝の意を表します。

さらに、本論文作成にあたり、ご教授とご校閲をいただきました城西大学薬剤学研究室教授 従二和彦 先生ならびに城西大学医薬品化学研究室教授 坂本武史 先生に御礼申し上げます。

最後に、有益なご意見ならびに実験のご協力をいただきました城西大学薬学部旧製剤学教室 高野みどり（旧姓：鍵野） 修士ならびに城西大学薬学部旧臨床薬物動態学講座 飯高大 修士をはじめとする城西大学関係諸氏、ならびに埼玉医科大学総合医療センター薬剤部関係諸氏に深く感謝いたします。

## 引用文献

1. Liu, P., Kurihara-Bergstrom, T., Good, W. R., Cotransport of Estradiol and ethanol through human skin in vitro: Understanding the permeant /enhancer flux relationship, *Pharm. Res.*, **8**, 938-944 (1991).
2. Kobayashi, D., Matsuzawa, T., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Kimura, M., Analysis of the combined effect of 1-menthol and ethanol as skin permeation enhancers based on a two-layer skin model, *Pharm. Res.*, **11**, 96-103 (1994).
3. Sugibayashi, K., Yanagimoto, G., Hayashi, T., Seki, T., Juni, K., Morimoto, Y., Analysis of skin disposition of flurbiprofen after topical application in hairless rats, *J. Control. Release*, **62**, 193-200 (1999).
4. Walters, K. A., Hadgraft, J.,(eds) "Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement", 1st ed., Marcel Dekker, New York (1993).
5. Behl, C. R., Kumar, S., Malick, A. W., Delterzo, S., Higuchi, W. I., Nash, R. A., Iontophoretic drug delivery: Effects of physicochemical factors on the skin uptake of nonpeptide drugs, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 355-360 (1989).
6. Chien, Y. W., Siddiqui, O., Shi, W. M., Lelawongs, P., Liu, J. C., Direct current iontophoretic transdermal delivery of peptide and protein drugs, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 376-383 (1989).

7. Tokudome, Y., Sugibayashi, K., Mechanism of the synergic effects of calcium chloride and electroporation on the in vitro enhanced skin permeation of drugs, *J. Control. Release*, **95**, 267–274 (2004).
8. Prausnitz, M. R., Bose, V. G., Langer, R., Weaver, J. C., Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance transdermal drug delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **90**, 10504-10508 (1993).
9. Mori, K., Watanabe, T., Hasegawa, T., Sato, S., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Effect of cathode and anode positions, frequency of applied pulse, and electrode materials at electroporation on the in vitro skin permeation of mannitol, *Drug Delivery System*, **14**, 485-490(1999)
10. Brucks, R., Nanavaty, M., Jung, D., Siegel, F., The effect of ultrasound on the in vitro penetration of ibuprofen through human epidermis, *Pharm. Res.*, **6**, 697-701 (1989).
11. Ueda, H., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Skin penetration-enhancing effect of drugs by phonophoresis, *J. Control. Release*, **37**, 291-297 (1995).
12. Kost, J., Pliquett, U., Mitragotri, S., Yamamoto, A., Langer, R., Weaver, J., Synergistic effect of electric field and ultrasound on transdermal transport, *Pharm. Res.*, **13**, 633-638 (1996).
13. Prausnitz, M. R., Microneedles for transdermal drug delivery,

- Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 581–587 (2004).
14. Jackson, L. A., Austin, G., Chen, R. T., Stout, R., DeStefano, F., Gorse, G. J., Newman, F. K., Yu, O., Weniger, B. G., Safety and immunogenicity of varying dosages of trivalent inactivated influenza vaccine administered by needle-free jet injectors, *Vaccine*, **19**, 4703–4709 (2001).
  15. Imoto, J., Konishi, E., Needle-free jet injection of a mixture of Japanese encephalitis DNA and protein vaccines: a strategy to effectively enhance immunogenicity of the DNA vaccine in a murine model, *Viral. Immunol.*, **18**, 205–212 (2005).
  16. Lindmayer, I., Menassa, K., Lambert, J., Moghrabi, A., Legendre, L., Legault, C., Letendre, M., Halle, J. P., Development of new jet injector for insulin therapy, *Diabetes Care*, **9**, 294–297 (1986).
  17. Agerso, H., Moller-Pedersen, J., Cappi, S., Thomann, P., Jesussek, B., Senderovitz, T., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new formulation of recombinant human growth hormone administered by ZomaJet 2 Vision, a new needle-free device, compared to subcutaneous administration using a conventional syringe, *J. Clin. Pharmacol.*, **42**, 1262–1268 (2002).
  18. Jovanovic-Peterson, L., Sparks, S., Palmer, J. P., Peterson, C. M., Jet-injected insulin is associated with decreased antibody production and postprandial glucose variability when

- compared with needle-injected insulin in gestational diabetic women, *Diabetes Care*, **16**, 1479–1484 (1993).
19. Theintz, G. E., Sizonenko, P. C., Risks of jet injection of insulin in children, *Eur. J. Pediatr.*, **150**, 554–556 (1991).
  20. Okumura, M., Sugibayashi, K., Ogawa, K., Morimoto, Y., Skin permeability of water-soluble drugs, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1404–1406 (1989).
  21. Ritger, P. L., Peppas, N. A., A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, *J. Control. Release*, **5**, 23–36 (1987).
  22. Higuchi, W. I., Analysis of data on the medicament release from ointments, *J. Pharm. Sci.*, **51**, 802–804 (1962).
  23. Bos, J. D., Meinardi, M. M., The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs, *Exp. Dermatol.*, **9**, 165–169 (2000).
  24. Baxter, J., Mitragotri, S., Jet-induced skin puncture and its impact on needlefree jet injections, experimental studies and a predictive model, *J. Control. Release*, **106**, 361–373 (2005).
  25. Schramm, J., Mitragotri, S., Transdermal drug delivery by jet injectors, energetics of jet formation and penetration, *Pharm. Res.*, **19**, 1673–1679 (2002).
  26. Yoshida, D., Todo, H., Hasegawa, T., Sugibayashi, K., Effect of molecular weight on the dermatopharmacokinetics and

- systemic disposition of drugs after intracutaneous injection, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **35**, 5–11 (2008).
27. Yoshida, D., Todo, H., Hasegawa, T., Sugibayashi, K., Effect of vasoactive agents on the dermatopharmacokinetics and systemic disposition of model compounds, salicylate and FITC-dextran 4 kDa, following intracutaneous injection of the compounds, *Int. J. Pharm.*, **356**, 181–186 (2008).
  28. Ohman, H., Vahlquist, A., The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and autosomal dominant ichthyosis, a clue to the molecular origin of the “acid skin mantle”?, *J. Invest. Dermatol.*, **111**, 674–677 (1998).
  29. Mumper, R.J., Cui, Z., Genetic immunization by jet injection of targeted pDNA coated nanoparticles, *Methods*, **31**, 255–262 (2003).
  30. Yoshida, D., Todo, H., Hasegawa, T., Sugibayashi, K., Dermatopharmacokinetics of salicylate following topical injection in rats: effect of osmotic pressure and injection volume on salicylate disposition, *Int. J. Pharm.*, **337**, 142–147 (2007).
  31. Tyle, P., Iontophoretic device for drug delivery. *Pharm. Res.*, **3**, 318–326 (1986).
  32. Green, P. G., Iontophoretic delivery of peptide drugs, *J. Control. Release*, **41**, 33–48 (1996).
  33. Numajiri, S., Inada, H., Sugibayashi, K., Morimoto, Y.,



- Iontophoretic transport of morphine across hairless rat skin:  
is a further increase obtained with chemical enhancer?,  
*Yakuzaigaku*, **58**, 29-36 (1998).
34. Singh, P., Anliker, M., Smith, G. A., Zavortink, D., Maibach, H. I., Transdermal iontophoresis and solute penetration across excised human skin, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 1342-1346 (1995).
35. Clemessy, M., Couarraze, G., Bevan, B., Puisieux, F., Mechanisms involved in iontophoretic transport of angiotensin, *Pharm. Res.*, **12**, 998-1002 (1995).
36. Inoue, N., Kobayashi, D., Kimura, M., Toyama, M., Sugawara, I., Itoyama, S., Ogiwara, M., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Fundamental investigation of a novel drug delivery system, a transdermal delivery system with jet injection, *Int. J. Pharm.*, **137**, 75-84 (1996).
37. Morimoto, Y., Numajiri, S., Sugibayashi, K., Effect of ion species and their concentration on the iontophoretic transport of benzoic acid through poly(vinyl acetate) membrane, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2412-2416 (1991).
38. Numajiri, S., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Analysis of in vitro iontophoretic permeation of sodium benzoate by transport numbers of the drug and pharmaceutical additives, *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1351-1356 (1996).
39. Ledger, P. W., Skin biological issues in electrically enhanced delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **9**, 289-307 (1992).

40. Numajiri, S., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Constant current and constant voltage iontophoretic transport of morphine hydrochloride through hairless rat skin in-vitro, *Pharm. Pharmacol. Commun.*, **4**, 529-534 (1998).
41. Sugibayashi, K., Kobayashi, D., Nakagaki, E., Hatanaka, T., Inoue, N., Kusumi, S., Kobayashi, M., Kimura, M., Morimoto, Y., Differences in enhancing effect of l-menthol, ethanol and their combination between hairless rat and human skin, *Int. J. Pharm.*, **113**, 189-197 (1995).
42. Kobayashi, D., Kawabata, S., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Kimura, M., In vitro/ in vivo differences in enhanced skin permeation of nicardipine hydrochloride by l-menthol-ethanol system, *Skin Pharmacol.*, **9**, 130-136 (1996).
43. Yukawa, J., Sugibayashi, K. and Morimoto, Y., Effect of various additives on the skin permeation of ketoprofen from the film forming transdermal formulation, *Yakuzaigaku*, **49**, 254 -262 (1989).
44. Skelly, J. P., Shah, V. P., Maibach, H. I., Guy, R. H., Wester, R. C., Flynn, G. and Yacobi, A., FDA and AAPS report of the workshop on principles and practices of in vitro percutaneous penetration studies: relevance to bioavailability and bioequivalence, *Pharm. Res.*, **4**, 265-267 (1987).
45. Washitake, M., Yajima, T., Anmo, T., Arita, T., Hori R., Studies on percutaneous absorption of drugs, III. Percutaneous

- absorption of drugs through damaged skin, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 2444-2451 (1973).
46. Kobayashi, S., Simple method for the determination of nicardipine in plasma using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **420**, 39-444 (1987).
  47. Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T., Uno, T., A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer., *J. Pharm. Dyn.*, **4**, 879-885 (1981).
  48. Sato, K., Oda, T., Sugibayashi, K. and Morimoto, Y., Estimation of blood concentration of drugs after topical application from in vitro skin permeation data. 1. Prediction by convolution and confirmation by deconvolution, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2232-2238 (1988).
  49. Nakashima, E., Ishikawa, F., Sato, H., Deguchi, Y., Tamai, I., Matsushita, R., Ichimura, F., Tsuji, A., Kinetics of peritoneal drug transport in rats: an application of the pore theory of transcapillary exchange, *J. Pharm. Sci.*, **77**, 481-488 (1988).
  50. Hatanaka, T., Manabe, E., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., An application of the hydrodynamic pore theory to percutaneous absorption of drugs, *Pharm. Res.*, **11**, 654-658 (1994).
  51. Morimoto, Y., Sugibayashi, K., Hosoya, K. and Higuchi, W.I., Penetration enhancing effect of Azone on the transport of 5-fluorouracil across the hairless rat skin, *Int. J. Pharm.*, **32**, 31-38 (1986).

52. Kobayashi, D., Matsuzawa, T., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Kimura, M., Analysis of the combined effect of 1-menthol and ethanol as skin permeation enhancers based on a two-layer skin model, *Pharm. Res.*, **11**, 96-103 (1994).